

Matti Leinonen

Transgeenisten Arabidopsis-kasvien proteiini-analyyttinen seulonta E3-ligaasitutkimusta varten

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko

Bioanalytiikan koulutusohjelma

Opinnäytetyö

19.4.2016

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Matti Leinonen Transgeenisten arabidopsis-kasvien proteiinianalyttinen seulonta E3-ligaasitutkimusta varten 65 sivua 19.4.2016
Tutkinto	Bioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan koulutusohjelma
Suuntautumisvaihtoehto	Bioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Lehtori Hannele Pihlaja Vastuututkija Kristiina Himanen
<p>Opinnäytetyö tehtiin osana Helsingin yliopiston maa- ja metsätaloustieteellisen tiedekunnan tutkimusryhmän projektia "The characterization of Flower related Ubiquitin Proteasome System in Arabidopsis". Tutkimusryhmän projektin tarkoituksena on tutkia miten kasvin ubikitiini-proteasomijärjestelmän komponentit vaikuttavat kasvien kehitykseen.</p> <p>Opinnäytetyön tarkoituksena oli seuloa transgeenisiä Arabidopsis thaliana-kasveja tulevia tutkimuksia varten. Seulottavia linjoja käytetään tutkimuksissa joissa tutkitaan proteiini-proteiini-interaktioita E3-ligaasien ja niiden hypoteettisten ubikitinaatiokohteiden välillä.</p> <p>Opinnäytetyön aikana kasvatettiin aiemmin tuotettujen transgeenisten kasvien siemenet, jonka jälkeen tuotettujen rekombinanttiproteiinien ekspressio varmistettiin immunoblottauksen avulla. Vain ne linjat, joissa insertoitu DNA voitiin havaita proteiinitasolla, ovat käyttökelpoisia jatkotutkimuksia varten. Seulottavat linjat erosivat toisistaan niiden sisältämien modifikaatioiden (nukleotidien substituution tai domeenin deleetion), käytettyjen proteiinimerkkien, käytettyjen vektorien ja kasvien taustan (joko villityyppi tai mutantti) mukaan. Samasta insertiolinjasta seulottiin useampi kasvilinja, jotta ainakin yksi niistä olisi käyttökelpoinen.</p> <p>Opinnäytetyön toteutuksen aikana käytettiin seuraavia laboratoriomenetelmiä. Selektiomaaljojen valmistus, siementen keräys, sterilointi ja viljely, segregatioanalyysi, proteasomi-inhibiittori-käsittely, kasviproteiinien eristys, proteiinipitoisuuksien määrittäminen Bradfordin menetelmän avulla sekä proteiininäytteiden SDS-PAGE ja Western Blot.</p> <p>Suurimmasta osasta tutkituista insertiolinjoista saatiin ainakin yksi linja, jota voidaan käyttää tulevaisuudessa jatkotutkimuksiin. Linjojen perusteella voidaan tutkia vaikuttaako tietyn E3-ligaasin yliekspressio tai ekspression puute sen ubikitinaatiokohteen ekspression ja siten myös sen aktiivisuuteen kasvisolussa ja miten tämä vaikuttaa kasvin kehitykseen ja sen fenotyyppiin.</p>	
Avainsanat	FUPS, ubikitiini-proteasomijärjestelmä, Western Blot, E3-ligaasi, Arabidopsis thaliana

Author(s) Title	Matti Leinonen Screening of Transgenic Arabidopsis-plants for E3-ligase experiments
Number of Pages Date	65 pages 19 April 2016
Degree	Bachelor of Health Care
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Specialisation option	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Kristiina Himanen, Ph.D, Academy Researcher Hannele Pihlaja, Senior Lecturer
<p>This thesis is a part of a project conducted at the University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Agricultural Sciences. The name of the project is "The characterization of Flower related Ubiquitin Proteasome System in Arabidopsis" and its goal is to determine the components in plants ubiquitin proteasome pathway and to find out what is their part in the plants development.</p> <p>The purpose of this study was to screen genetically modified Arabidopsis thaliana plants in order to find suitable lines for future experiments. The screened lines are used to elucidate protein-protein interactions between E3-ligases and their hypothesized ubiquitination targets.</p> <p>Seeds of the transgenic plants were grown in vitro and afterwards the expression of the produced recombinant proteins was verified with the use of immunoblotting. Only the plant lines in which the expression of the inserted DNA could be detected on protein level are useful in the planned future experiments. Various screened lines differed from each other in their modifications (nucleotide substitutions or domain deletions), the used amino acid tags, the used vectors and the plant background (wild type or mutant). More than one plant line was screened from a single insertion line so that at least one of the lines could be used in the future experiments.</p> <p>During the thesis work, the following laboratory work was performed. Preparation of the selection media, seed collection, sterilization and sowing, segregation analysis, proteasome inhibitor treatment, plant protein extraction, protein quantification with Bradford-measurement and SDS-PAGE and Western Blotting of the protein extracts.</p> <p>At least one useful line was discovered from most of the insertion lines. The screened lines can be used to see if the over expression or the lack of expression of a specific E3-ligase will affect the expression of its ubiquitination target and thus its activity inside the plant cell and how this affects the plants development and its phenotype.</p>	
Keywords	FUPS, ubiquitin proteasome system, Western Blot, E3-ligases, Arabidopsis thaliana

Sisällys

1	Johdanto	1
1.1	Tutkimuksen hyödyt	1
1.2	Opinnäytetyö	2
1.3	Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet	2
2	Ubikitiini-proteasomijärjestelmä	3
2.1	Proteolyysi	3
2.2	Ubikitiini	4
2.3	E1 - ubikitiinin aktivoiva entsyymi	5
2.4	E2 - ubikitiinin konjugoiva entsyymi	6
2.5	E3 - ubikitiiniligaasit	6
2.6	Proteasomi	7
2.7	Muut ubikitiini-proteasomijärjestelmän komponentit	8
2.8	Ubikitinaation ja proteasomin muut tehtävät	9
2.9	Tutkittavat entsyymit ja proteiinit	9
2.9.1	E3a ja ARR1	10
2.9.2	E3b ja SLK2	12
3	Menetelmät	12
3.1	Proteiinimerkit	13
3.1.1	Yhdistelmä-DNA-tekniikka	13
3.1.2	Proteiinimerkkien käyttö	14
3.2	Vasta-aineen valinta	16
3.3	Transgeenisten kasvien kasvattaminen ja käsittely	17
3.3.1	Kasvatusalustojen valmistus	17
3.3.2	Siementen sterilisointi	18
3.3.3	Siementen viljely	18
3.3.4	Proteasomi-inhibiittori-käsittely	18
3.4	Proteiinien eristys	19
3.4.1	Proteiinien eristys kasveista	19
3.5	Proteiinien konsentraation mittaaminen	20
3.6	SDS-PAGE	20
3.7	Western Blot	22
3.8	Coomassie-värjäys	24

4	Tutkimuksessa käytetyt kasvit	25
4.1	Arabidopsis thaliana	25
4.2	Kasvinlinjat	26
4.2.1	Kahden konstruktin linjat (dd-linjat)	30
4.2.2	Kontrollit ja muut näytteet	31
5	Toteutus	31
5.1	Kasvinlinjojen kehitys ja valinta	32
5.2	Kasvatusalustojen valmistus	33
5.3	Sterilointi	33
5.4	Viljely	33
5.5	Segregaatioanalyysi	34
5.6	Proteasomi-inhibiittorikäsittely	35
5.7	Proteiinien eristys	36
5.8	Proteiinipitoisuuksien mittaaminen	37
5.9	Western Blot	38
6	Tulokset ja arviointi	38
6.1	Ensimmäinen sarja	40
6.2	Toinen sarja	44
6.3	Kolmas sarja	49
6.4	Neljäs sarja	53
6.5	Viides sarja	57
6.6	Arviointi	60
6.7	Luotettavuuden ja eettisyyden arviointi	61
6.8	Jatkotutkimukset	62
	Lähteet	63

1 Johdanto

Tämä opinnäyte suoritettiin Helsingin yliopiston maa- ja metsätaloustieteellisessä tiedekunnassa. Toteutus oli osa laitoksen tutkimusryhmän tekemää tutkimusprojektia, ”The characterization of Flower related Ubiquitin Proteasome System in Arabidopsis”, joka selvittää kasvien kehitykseen ja kasvuun vaikuttavia tekijöitä. Opinnäytetyön toteutus on osa tutkimusryhmän jäsenen tekemää tohtorintutkintoa. Vastaavana tutkijana toimi Kristiina Himanen ja käytännön ohjaajana Marcelina Bilicka.

Tutkimusryhmä keskittyy ubiquitiini-proteasomijärjestelmään (flower ubiquitin proteasome system, FUPS) ja pyrkii tunnistamaan, mitkä sen komponentit osallistuvat kasvien toiminnan ja kehityksen säätelyyn ja miten ne toimivat. Tutkimusryhmä pyrkii myös tunnistamaan kasvisolun prosessit, jotka ovat riippuvaisia FUPS:sta sekä löytämään kukan kehitysvaiheisiin liittyvät kehitysbiologian katkaisijat, jotka ohjaavat kukan kehitystä asteelta toiselle.

1.1 Tutkimuksen hyödyt

Kasvava ymmärrys kasvien toiminnasta ja kehityksestä vastaavista tekijöistä johtaa moniin hyötyihin. Uuden tiedon perusteella voidaan kasveja muokata bioteknologian menetelmin ja kehittää uudenlaisia ominaisuuksia kasveihin esimerkiksi maatalouden tarpeisiin. Uudet, muokatut kasvit voivat sietää ympäristön muutoksia ja stressiä paremmin ja tuottaa suuremman sadon. Tieto kukkien kehityksen eri vaiheisiin johtavista prosesseista, ja siitä miten kasvit säätelevät näitä vaiheita, mahdollistaisivat kasvun tarkemman säätelyn myös viljelykasveilla. Kasvibiotekniikalla muokatut kasvit voisivat osaltaan tukea kestäväää maataloutta ja helpottaa maanviljelyä haastavissa ympäristöissä ja siten helpottaa ruuan puutteesta johtuvia ongelmia.

Tutkimusryhmän tekemä tutkimus on perustutkimusta, jonka tarkoituksena on tuottaa yleistä tietoa, jota voidaan käyttää tarkemmissa sovelluksissa. Tarkempi geeni- ja molekyyli-tason tieto on hyödyllistä perinteisessä kasvijaalostuksessa, joka on aiemmin laajalti perustunut heikosti tunnettuihin biologisiin prosesseihin. Geenitason tieto mahdollistaa jalostettavien kasvikantojen kohdennetumman valinnan. Kasvisolujen komponent-

tien ja toiminnan on osoitettu olevan suurelta osin yhtenevä eri kasvilajeilla, mikä mahdollistaa tutkimuksessa käytettyjen malliorganismien perusteella löydetyn tiedon käyttämisen yleisesti muillakin lajeilla, kuten maatalouskasveilla (Helariutta 2002: 172).

1.2 Opinnäytetyö

Tutkimusryhmän jäsenet keskittyvät tiettyjen kasvien kehitykseen liittyvien entsyymien tutkimiseen. Tämän opinnäytetyön toteutuksessa avustetaan erästä tutkimusryhmän jäsentä hänen tohtorinopintoihinsa liittyvässä tutkimuksessa.

Tutkimus kohdistuu E3-ligaaseihin, jotka ovat monilukuinen proteiiniperhe ja tärkeitä komponentteja ubiquitiini-proteasomijärjestelmässä. Tutkimusta varten valittiin kaksi E3-ligaasia, jotka tutkimusryhmän hypoteesin perusteella säätelevät tiettyjen kasvin toiminnalle tärkeiden proteiinien kontrolloitua hajotusta ja siten niiden pitoisuutta ja aktiivisuutta soluissa.

1.3 Opinnäytetyön tarkoitus ja tavoitteet

Opinnäytetyön tarkoituksena oli geneettisesti modifioitujen *Arabidopsis thaliana*-kasvien seulonta onnistuneesti tuotettujen linjojen löytämiseksi. Tavoitteena on saada mahdollisimman paljon käyttökelpoisia kasvilinjoja seulottavista insertiolinjoista. Linjoja käytetään tulevaisuudessa tutkimuksissa, jossa pyritään osoittamaan kahden RING E3-ligaasiin ja niiden hypoteettisten ubiquitinaatiokohteiden välinen proteiini-proteiini-interaktio.

Työhön kuului useampia vaiheita.

- Geenimuunneltujen arabidopsis-kasvien in vitro-kasvatus ja transgeenin segregatioanalyysi.
- Halutun rekombinanttiproteiinin tuoton varmistus. Vain ne kasvit, joissa insertoitu DNA voidaan havaita proteiinitasolla, ovat käyttökelpoisia suunnitelluissa tutkimuksissa.

Tavoitteiden saavuttamiseksi tehtiin seuraavat työt laboratoriossa.

- Kasvatusalustojen valmistus
- Siementen keräys, sterilisaatio ja viljely kasvatusalustoille
- Kasvatettujen taimien selviytymisprosenttien laskeminen

- Proteasomi-inhibiittorikäsittely proteiinien suojelemiseksi
- Kasvinäytteiden keräys ja säilytys
- Kasvien proteiinieristys, proteiinipitoisuuksien mittaaminen
- Proteiinien erottelu SDS-PAGE ja Western Blot menetelmillä

2 Ubikitiini-proteasomijärjestelmä

2.1 Proteolyysi

Ubikitiini-proteasomijärjestelmä on jokaisessa eukaryoottisessa solussa oleva järjestelmä. Sen tehtävä on hajottaa proteiineja tarpeen mukaan ja siten osaltaan säädellä solun toimintaa ja elinkiertoa. Ubikitiini-proteasomijärjestelmään kuuluu 26S-proteasomi, ubikitiini sekä E1, E2 ja E3-entsyymiperheet. (Vierstra 1993: 385.)

Jokaista kasvin elinkaaren vaihetta säätelee ohjattu polypeptidien synteesi ja vanhojen proteiinien tarkka hajotus. Nukleiinihappojen transkription ja translaation osuus tässä proteiinikierrossa on ollut jo vuosikymmenten ajan tunnustettu mutta vasta viime aikoina on alettu ymmärtää proteiinin säädellyn katabolian tärkeys. Proteiinien on osoitettu hajoavan säädellysti tietyssä solukierron vaiheessa, tietyn ympäristötekijän tai metabolisen kehitysvaiheen jälkeen. Monien solunsisäisten proteiinien hajotus on ATP:stä riippuvaista eli se vaatii energiaa. Proteiinisidosten hydrolysoituminen ei itsessään vaadi energiaa, joten proteolyysin tulee taten olla jollain tavalla säädeltyä tarkoituksella (Callis, 1995). Proteolyysi ei pelkästään poista viallisia ja väärin muodostuneita proteiineja vaan se osallistuu myös solun toiminnan säätelyyn hajottamalla entsyymejä ja metabolisia säätelyverkostoja. Näin se hienosäätää kasvin homeostasiasia, sopeuttaa uusiin ympäristöihin ja ohjaa kasvua ja kehittymistä. (Vierstra 1993: 385–388.)

Proteolyysi ohjaa typen vapautumista kasvissa hajottamalla siemenen itämisvaiheessa varastoproteiineja, josta saatavat aminohapot käytetään kasvavan taimen proteiinisynteesiin. Aikuisissa kasveissa selektiivinen proteolyysi hajottaa inaktivoituneita, denaturoituneita, kokoamattomia ja epänormaaleja proteiineja ja siten estää niiden tuottamia haitallisia vaikutuksia kasvisoluissa. Proteolyysi myös säätelee entsyymien ja reseptorien pitoisuutta, joka vaikuttaa solunsisäisten signaalien kulkuun ja vaikutusvahvuuteen. Proteolyysi myös säätelee solusykliin vaikuttavien kinaasien aktiivisuutta joka säätelee

kasvisolujen siirtymistä solukierron vaiheesta toiseen. Proteolyysiin osallistuvia komponentteja koodaavien geenien toiminnan on osoitettu kiihtyvän, kun kasvi altistuu ympäristön stressitekijöille. Kahta erilaista kysteiiniproteinaasia koodaavien mRNA-ketjujen pitoisuus kasvoi kuivuudesta tai suuresta suolapitoisuudesta kärsivällä arabidopsis-kasvilla (Callis, 1995: 845).

Proteolyysin merkityksen ymmärtämiseen on auttanut viime aikoina saatu kasvava tietomäärä Ubikitiini-proteasomijärjestelmästä, joka on dominoiva proteolyttinen järjestelmä kasveissa. Tässä järjestelmässä ubikitiini-proteiini toimii signaalina säädellylle proteiinien hajottamiselle. Polymerisoituneet ubikitiinit tarttuvat kovalenttisesti kolmivaiheessa konjugaatioreaktioketjussa kohdeproteiiniin, jonka valinta on tarkasti säädelty. Tämän jälkeen ubikitinoitu proteiini joutuu 26S-proteasomin hajotettavaksi, jolloin ubikitiinit vapautuvat uudestaan käytettäviksi. Tämän syklin avulla ubikitiini-proteasomijärjestelmä hajottaa vialliset proteiinit ja lyhytikäiset säätelyproteiinit ja täten vaikuttaa kaikkiin kasvin sisäisiin metabolisiin tapahtumiin. Kasvien kohdalla erilaiset tunnistetut ubikitiini-proteasomijärjestelmän komponentit viittaavat siihen, että tämä katabolinen järjestelmä on ainakin yhtä tärkeä kasvin solufunktioiden säätelijä kuin transkriptio ja proteiinien fosforylaatio. Arabidopsisin ubikitiinisignalointiin liittyvien geenien ylliedustus verrattuna muihin mallieliöinä käytettyihin eukaryooteihin on yksi osoitus tästä. (Vierstra 2003: 135.)

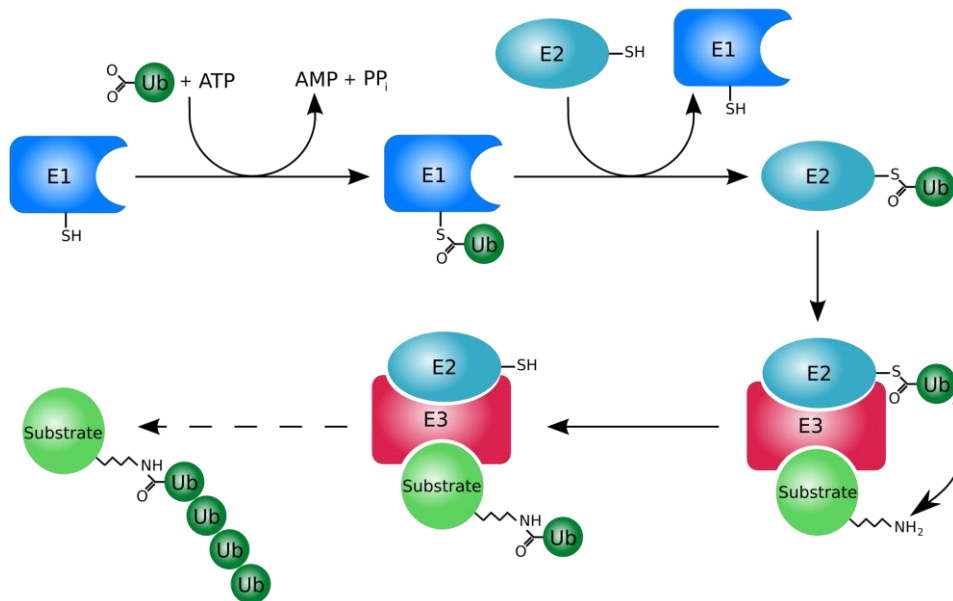
2.2 Ubikitiini

Ubikitiini on kaikista eukaryoottisista soluista löytyvä pienikokoinen proteiini (76 aminohappoa), joka eroaa vain kolmen aminohapon osalta vertailtaessa hiivaa, ihmisiä ja kasveja. Ubikitiinin lukuisat intramolekyläariset vetysidokset antavat sille erittäin hyvän stabiliteetin, joka estää sen denaturaation ja siten edistää sen uudelleenkäyttöä. Ubikitiiniproteiineissa on c-päädyssä lisäke, jonka päässä on glysiini. Tämän glysiinin karboksyyli-ryhmä pystyy tarttumaan kovalenttisesti kohdeproteiiniin E1, E2 ja E3-entsyymien avulla. Ubikitiinin tuotanto kasvilla lisääntyy nopean kasvun ja stressin aikana, joka osaltaan osoittaa sen tärkeyden osana lyhytikäisten säätelyproteiinien hajottamista. (Vierstra 1993: 386.)

Ubikitiini tarttuu hajotettavaan kohdeproteiiniin kolmivaiheisessa konjugaatiokaskadissa, joka käyttää ATP:tä. Ensimmäisessä vaiheessa E1 eli ubikitiinin aktivoiva entsyymi ka-

talysoi fosfoanhydridisidoksen syntymisen ATP:n monofosfaatin ja ubikitiinin C-pään glysiinin karboksyyli ryhmän kanssa. Aktivoitu ubikitiini pystyy näin muodostamaan vakaan thiolesteri-sidoksen E1-kysteiinin kanssa. (Sadanandom ym. 2012: 14.)

Aktivoitu ubikitiini siirtyy E1:ltä E2:lle (ubikitiinin konjugoiva entsyymi) transesterifikaation kautta. E2:n ja ubikitiinin muodostama kompleksi kuljettaa ubikitiinin kohdeproteiinin vastaanottavan lysiniin luokse E3:n (ubikitiiniligaasi) avulla. E3 auttaa tunnistamaan kohdeproteiinin ja joko siirtää ubikitiinin suoraan proteiiniin E2:sta tai muodostaa ubikitiinin kanssa kompleksin ennen siirtoa. Lopputilanteessa ubikitiinin C-pään glysiinin ja kohdeproteiinin lysiniin välillä on isopeptidisidos. Uudet ubikitiinit voivat muodostaa ketjun kohdeproteiinissa olevan ubikitiinin kanssa kiinnittymällä glysiinitähteisiin muodostaen polyubikitiiniketjun. Sillä onko kohdeproteiini mono- vai polyubikitinoitu, on vaikutusta siihen mitä sille tapahtuu. (Sadanandom ym. 2012: 14.)



Kuvio 1. Ubikitinaatio. Oikealla HECT-domeeni ja E2-entsyymikompleksi. Kuva: Rogerdodd.

2.3 E1 - ubikitiinin aktivoiva entsyymi

E1-entsyymit toimivat ubikitiinin konjugaatiokaskadin aloittajina. Kasveissa sillä on yksi polypeptidi, joka on noin 1100 aminohapon pituinen. Siinä oleva kysteiini tarttuu kiinni ubikitiiniin. Arabidopsiksessa on kaksi E1-isoformia. (Sadanandom ym. 2012: 14.)

2.4 E2 - ubikitiinin konjugoiva entsyymi

E2-entsyymit kuljettavat aktivoitun ubikitiinin E3-ligaasille. Arabidopsiksen genomista on tunnistettu 37 E2-isoformia. Eri isoformeilla on yksilölliset N- ja C-päädyn lisäkkeet, joiden uskotaan osallistuvat kohteen tunnistukseen. Eri isoformeilla on eri toiminnot solussa ja ne toimivat yhteistyössä spesifien E3-entsyymien kanssa. Konjugaatiokaskadin aikana sekä E1- että E3-entsyymit tarttuvat samaan kohtaan E2-entsyymissä. (Sadanandom ym. 2012: 14-15.)

2.5 E3 - ubikitiiniligaasit

E3-ligaasit ovat monilukuinen entsyymiperhe, jotka jaotellaan eri ryhmiin niiden rakenteen ja toiminnan perusteella. E3-ligaasien tehtävä on tunnistaa kohdeproteiini, johon ubikitiini tulee kiinnittää. Kukin E3-ligaasi tunnistaa eri E2-entsyymien ja kohdeproteiinin. Arviolta 1400 geeniä arabidopsiksen genomissa koodaa eri E3-ligaaseja. Ne ovatkin ubikitiinaatiokaskadin monimuotoisimpia komponentteja. (Sadanandom ym. 2012: 15.) E3-ligaasien monimuotoisuuden ja niiden tärkeän tehtävän takia niihin kohdistuu paljon tutkimusta. Usein tutkija valitsee tietyn ligaasin, jonka tutkimiseen hän keskittyy (Moon – Parry – Estelle 2004: 3191). Tämän opinnäytetyön toteutus on osa kahteen E3-ligaasiin kohdistuvaa tutkimusta, joka johtaa tulevaisuudessa kahden tieteellisen artikkelin julkaisemiseen.

Kasvien E3-ligaasit jaotellaan neljään eri tyyppiin. HECT E3-ligaasit ovat yksittäisiä polypeptidejä, jotka voidaan tunnistaa niiden 350-aminohappoisesta HECT domeenista. Ne ovat tyypillisesti suurikokoisia proteiineja (96–405 kDa). Toisin kuin muut E3-ligaasit, ne muodostavat ubikitiinin kanssa thio-esteri väli- tai muodon, joka toimii proksimaalisena ubikitiinin luovuttajana ligaation aikana. Proteiinin HECT-alueella ennen sijaitsee muita toiminnallisia alueita, jotka osallistuvat kohdeproteiinin tunnistukseen ja ubikitiinin sitomiseen. (Smalle – Vierstra 2004: 559.)

RING/U-Box E3-ligaasit ovat joukko polypeptidejä, jotka kuuluvat etäisesti samaan ryhmään. Niillä on joko RING-sormiosa tai rakenteellisesti erilainen osa U-Box. Kasvien sekvenssianalyysin avulla on onnistuttu määrittämään iso määrä näitä entsyymejä. Arabidopsiksen genomi koodaa 480 RING-sormen sisältävää proteiinia ja 64 U-Boxin sisältävää proteiinia. RING/U-Box toimii Ub-E2 telakkana, joka allosteerisesti aktivoi ubikitiinin siirron substraatin lysiiniin. (Smalle – Vierstra 2004: 560.)

SCF E3-ligaasit koostuvat ainakin neljästä polypeptidistä. Alun perin ryhmä sai nimensä kolmen löydetyn alayksikön mukaan; SKP1, CDC53 (tai Cullin) ja F-Box proteiinin mukaan. Neljännessä alayksikössä (RBX tai ROC1 ja HRT1) on RING H2 tyyppinen domeeni. DCF E3-ligaasit toimivatkin samalla tavalla kuin RING/U-Box E3-ligaasit tuomalla aktivoituneen Ub-E2 kompleksin ja kohdeproteiinin yhteen muodostamatta E3-Ub väli- muotoa. (Smalle – Vierstra 2004: 560.)

Kasvit kykenevät syntetisoimaan valtavan suuren määrän erilaisia SCF-komplekseja verrattuna toisiin eukaryoottisoluihin. Arabidopsiksella on melkein 700 F-Box-proteiineja koodittavia geenejä. Tämän lisäksi kasvit voivat tuottaa kahta RBX1-alayksikköä, ainakin viittä erilaista Cullinia ja 21 erilaista SKP-alayksikköä. (Smalle – Vierstra 2004: 560–561.)

APC on kaikkein monimutkaisin E3-tyyppi, sillä ollen ainakin 11 eri alayksikköä. Suurin osa näistä alayksiköistä on yhden geenin koodaamia, joten arvellaan että toisin kuin RING/U-Box ja SCF E3-ligaasit, vain pieni määrä APC-isoformeja tulee muodostumaan. (Smalle – Vierstra 2004: 561.)

2.6 Proteasomi

26S proteasomi on moniosainen, ATP:stä riippuvainen proteolyttinen proteiinikompleksi, joka hajottaa ubikitiini-konjugaatteja. Se koostuu 31 alayksiköstä, jotka jakautuvat kahteen alakompleksiin (Smalle – Vierstra 2004: 562). Nämä ovat proteolyttinen keski-osa sekä säätelyosa, joka toimii kannen tavoin. (Solunetti 2006.)

Keskiosalla on sylinterimäinen rakenne, joka koostuu neljästä heptameerisestä renkaasta. Renkaat muodostuvat alfa- ja beetaosista. Renkaiden keskiosa on kammio, jonka keskelle osoittavat beetaosien (beeta1, beeta2, beeta5) muodostamat proteaasin aktiiviset osat. Proteaasit tuottavat peptidyyli-glutamyyliä (trypsin like, chymotrypsin like), joka pystyy katkaisemaan useimpia peptidisidoksia. Alfaosat säätelevät proteiinin pääsyä kammioon. Sisään pääsy vaatii proteiinin kolmiulotteisen rakenteen hajoamista. (Sadanandom ym. 2012: 18.)

Proteasomin säätelyosassa on 17 alayksikköä, jotka muodostavat kaksi alakompleksia, joita kutsutaan kanneksi ja alustaksi. Alusta on kiinnittynyt keskiosan alfaosiin. Kansi

toimii alustan kanssa RPN10-alaosan avulla. Yhdessä kansi ja alusta säätelevät proteiinien kanssa yhdistettyjen ubikitiiniketjujen tunnistusta, niiden kovalenttisten sidosten poistamista, proteiinien avautuminen ja substraatin siirtoa proteasomin sisään. Säätelyosan alaosien rakenne, rooli ja funktiot ovat vielä tutkimuksen kohteena, mutta säätelyosan päätehtävistä vastuussa olevat alayksiköt on jo tunnistettu. RPN10 tunnistaa substraattiin kiinnittyneet ubikitiinit, mutta sen ei uskota olevan ainoa alayksikkö, joka pystyy tähän. (Haartman-Petersen – Gordon, 2004: 1589.) RPN11 on sinkki-metalloproteaasi, jolla on poly-ubikitiinin hajotusaktiiviteettia. Se hajottaa ubikitiiniketjuja ja kierrättää ne proteiinin hajotuksen aikana. Alustan ATPase-alayksiköt säätelevät substraatin tertiäärisen rakenteen hajotusta ja sen pääsyä protasomin keskiosaan yhdessä keskiosan alfaosien kanssa. Muut säätelyosan alayksiköiden uskotaan toimivan ubikitiinilla merkittyjen proteiinien ja spesifisten E3-ligaasien reseptoreina. (Sadanandom ym. 2012: 18.) Tutkimukset liittyen substraatin kuljetukseen ja tunnistukseen viittaavat eri substraattityypeille spesifisiin reseptoreihin. (Haartman-Petersen – Gordon 2004: 1590.)

Säätelyosa tunnistaa ubikitiinin ja irrottaa sen hajotettavasta substraatista. Säätelyosa hajottaa proteiinin laskoksen käyttäen ATP:n energiaa ja siirtää polypeptidiketjun keskiosaan, jossa proteolyysi tapahtuu. Katalyyttiset reaktiot hajottavat polypeptidin muuttaman aminohapon pituisiksi oligopeptideiksi. Polypeptidin hajottaminen keskiosassa ei vaadi ATP:n energiaa. (Solunetti 2006.)

2.7 Muut ubikitiini-proteasomijärjestelmän komponentit

Ubikitiinin ligaatio substraattiin on kovalentti mutta reversiibeli prosessi. Niiden irrottamiseen kohdeproteiinista vaaditaan deubikitinoiva entsyymi (DUB). Deubikitinoivia entsyymejä on tunnistettu useita eri tyyppisiä ja niillä on useita tärkeitä toimintoja ub-proteasomi-säätelystä. (Sadanandom ym. 2012: 17.)

DUB-entsyymit varmistavat ubikitiinin tarpeeksi korkean pitoisuuden soluissa, jotta normaali proteolyysi ei keskeytyisi. Ubikitiinin poiston kohdeproteiineista lisäksi DUB-entsyymit prosessoivat translaation tuottamia ubikitiinin prekursoreita. Aktivoituneet ubikitiinit ovat alttiimpia solun sisäisten nukleofiilien hyökkäyksille. Estääkseen aktivoituneiden ubikitiinien hajotusta DUBit estävät näiden aineiden titraatiota. (Sadanandom ym. 2012: 17.)

DUB-entsyymit toimivat lisäksi proteolyysin negatiivisina säätelijöinä. Tarvittaessa DUBit estävät kohdeproteiinin hajotuksen poistamalla siitä ubikitiinia ennen sen kulkeutumista proteasomiin. Niiden uskotaan toimivan myös proteolyysin esitarkastajina estäen virheellisesti merkittyjen proteiinien hajotuksen proteasomin toimesta. (Sadanandom ym. 2012: 17.)

Deubikitinoivien entsyymien tarkka toiminta ja metaboliset sekä substraattispesifiset roolit ovat jatkuvan tutkimuksen kohteena (Sadanandom ym. 2012: 17). Se on kuitenkin tämän opinnäytetyön aihealueen ulkopuolella.

2.8 Ubikitinaation ja proteasomin muut tehtävät

Ubikitiiniproteasomijärjestelmän komponenteilla on osoitettu olevan muitakin perinteisistä poikkeavia toimintoja. Tutkimukset ovat liittyneet vain eläin- ja hiivasoluihin, mutta on todennäköistä että kasveillakin on samanlaista toimintaa. (Vierstra 2003.)

Yhden ubikitiinin liittäminen histoniin voi ilmeisesti estää tai tehostaa geenien ilmene- mistä vaikuttamalla metylaatioon. Joidenkin membraaniin sitoutuneiden resepto- rien/transportereiden monoubikitinaatio ei johda niiden hajotukseen proteasomissa vaan se kuljettaa ne endosomin säätelössä kuljetusreitissä lysosomiin tai vakuoliin hajotet- tavaksi (Hicke 2001). Monoubikitinaatiota käytetään myös uusien proteiinien kuljetuk- seen solupinnan reseptoreiksi (Vierstra 2003).

Ubikitinoitujen proteiinien täydellisen hajotuksen lisäksi 26S proteasomi ilmeisesti hajot- taa tiettyjä substraatteja vain osittain. Tietyt tutkitut transkriptiotekijät (ihmisen NF-KB ja hiivan Spt23 ja Mga2) ovat epäaktiivisia proteiinisynteesin jälkeen ja ne muuttuvat aktii- visiksi vasta ubikitinaation ja proteasomin käsittelyn jälkeen. (Hoppe ym. 2000: 577.)

2.9 Tutkittavat entsyymit ja proteiinit

Kasvin kyky havaita ympäristön stressitekijöitä ja reagoida niihin, on riippuvainen oike- anlaisesta geeniekspressiosta ja sen säätelystä. Muuttuva elinympäristö johtaa sekä geenien ilmenemisen kasvuun että vähenemiseen. Stressin takia tuotettavat proteiinit voivat toimia suoraan kasvin toiminnan tai kehityksen säätelijöinä tai välillisesti esimer- kiksi transkriptiotekijöinä. (Shrestha ym. 2014: 54.)

Tämän opinnäytetyön toteutuksessa keskityttiin kahden E3-ligaasiin toimintaan ja niiden osallisuuteen kasvin kehityksen ja toiminnan säätelyssä. Koska tutkimus on vielä kesken, ja sen tulokset julkaistaan vasta tulevaisuudessa, ei tutkittaviin entsyymeihin viitata niiden oikeilla nimillä vaan niistä käytetään nimityksiä E3a ja E3b. Tämän vuoksi kyseisiä entsyymejä kuvataan tässä vain hyvin yleisellä tasolla.

Tutkimusryhmän hypoteesin mukaan E3a ja E3b vaikuttavat kukin yhden proteiinin määrään kasvilla. Tunnistamalla kohdeproteiinin, E3-ligaasi auttaa proteiinin merkitsemistä ubiquitiinilla proteolyysiä varten ja siten osallistuu sen säädeltyyn hajottamiseen. E3a:n toiminnan uskotaan vaikuttavan negatiivisesti ARR1-proteiinin määrään kasvisolussa. E3b taas vaikuttaa SLK2-proteiinin määrään.

2.9.1 E3a ja ARR1

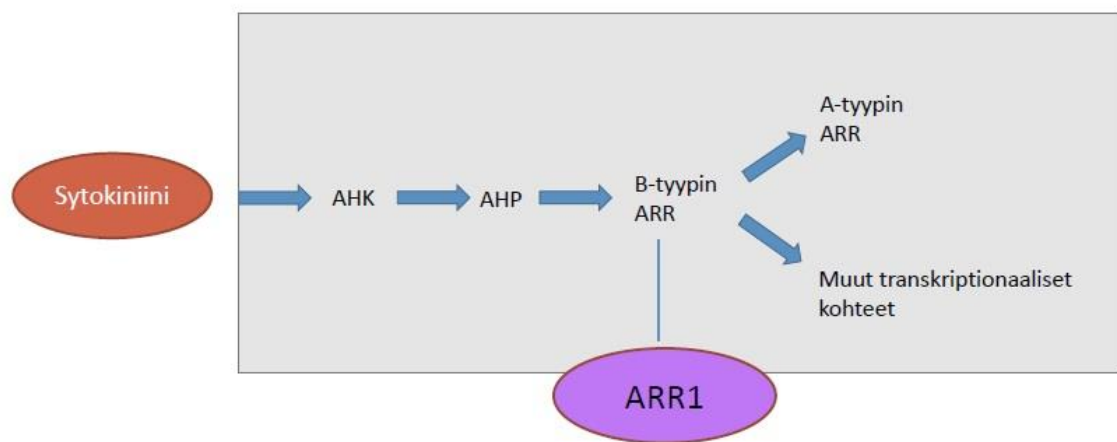
E3a on E3-ligaasi, jonka tiedetään toimivan estäjänä valokehityksessä (fotomorfogeneesiksessä) ja olevan aktivaattorina etiolaatiossa pimeässä. Se estää fotomorfogeneesiä pimeydessä ubiquitinoimalla valon aktivoimia transkriptiotekijöitä kuten HY5, HYH ja LAF1. E3a:ssa on RING-sormi-rakenne.

ARR1 (Arabidopsis Response Regulator 1) on proteiini, joka toimii transkriptiotekijänä. Se on yksi "type-B response regulator"-tyypin proteiineista. Ne toimivat positiivisina säätelijöinä osana sytokiniinin signaalireittiä (Argyros ym. 2008: 2102). Tutkimusryhmän hypoteesin mukaan E3a:n kohdeproteiini on ARR1. Aiemmin julkaistun tutkimuksen mukaan toinen E3-ligaasi (SCFKMD) toimii toisen ARR-proteiinien säätelijänä. Osana tutkimusryhmän kokonaisstrategiaa on näiden E3-ligaasien mahdollisen vuorovaikutuksen selvittäminen.

Sytokiniinit ovat kasvihormoneja, jotka oleellisesti osallistuvat kasvin kehityksen ja toiminnan säätelyyn. Ne säätelevät solujakaantumista ja metaboliaa, kasvin version ja juuren kehitystä ja stimuloivat kloroplastin kehitystä. Sytokiniinien signaalinkulkua säätelee kaksiosainen järjestelmä (two-component signal transduction system, TCS), jota kasvit ja muut solut kuten bakteerit ja muut eukaryootit käyttävät ympäristön signaalien vastaanottamiseen (Argyros ym. 2008: 2102). Sitä kutsutaan kaksiosaiseksi, koska siihen kuuluu aina histidiiniproteiinikinaasi, joka vastaanottaa soluun tulevan signaalin sekä so-

lun sisäinen responsiregulaattori, johon signaali kulkeutuu kinaasilta. Kaksiosaisia järjestelmiä on useita erilaisia. Niihin kuuluu usein yksi tai useampi fosfaatin siirtäjä, jotka osallistuvat signaalin kuljetukseen. Kasvisoluilla tällainen järjestelmä on yleisin kaksiosainen signaalinkuljajärjestelmä. (Burr ym. 2014.)

Sytokiniinin signaalinkuljetuksessa histidiiniproteiinkinaasit (AHK) toimivat sytokiniinin reseptoreina. Sytokiniinin sitoutuessa reseptoriin se autofosforyloituu, jonka jälkeen fosfaattiosa kulkeutuu histidiini fosfotransferi proteiinille (AHP) joka siirtää signaalin AHK:lta tumen responsisäätelijälle (ARR), joka voi aktivoida tai repressoida transkriptiota. (Harvard 2010.)



Kuvio 2. Sytokiniinin säätelyreitti ja ARR1:sen paikka siinä. Mukailtu: Schaller ym. 2014.

ARR:at jaetaan ryhmiin niiden sekvenssin, osien rakenteen ja niiden transkriptionaalisen vasteen mukaan. Tyypin A ARR:at koostuvat vastaanottajaosasta ja lyhyestä karboksyy-lipäästä. Niiden uskotaan toimivan sytokiniinivasteen negatiivisina säätelijöinä. Niiden yliekspression solussa on osoitettu johtavan sytokiniinin sensitiivisyyden heikkenemiseen. B-tyypin proteiineilla on lisäksi DNA:han sitoutuva GARP-osa sekä transkriptionaalinen aktivaatio-osa. Tyypin B ARR:at ovat tumassa sijaitsevia transkriptiotekijöitä. Niiden yliekspressio solussa johtaa sytokiniinin primäärivasteeseen ilman solunulkoista sytokiniinia. (Ferreira – Kieber 2005: 521–522).

2.9.2 E3b ja SLK2

E3b on RING E3-ligaasi, jonka tiedetään säätelevän kasvien vuorokausirytmää. SLK2 (Seuss-Like 2) on multimeerisistä komplekseista koostuva proteiini joka toimii transkriptionaalisena adaptorina. Tutkimusryhmän hypoteesin mukaan E3b säätelee sen määrää solussa ja siten myös sen aktiivisuutta. SLK2 sai nimensä, koska se muistuttaa toiminnaltaan SEU:ta. SLK2 kuuluu SEUSS:in ja SEUSS-LIKE proteiinien kanssa ryhmään transkriptionaalisia adaptoreita, jotka säätelevät kukkimista ja alkion kehitystä. Niiden sekvenssi on samanlainen kuin Ldb-tyypin adaptorien. Transkriptionaalisten adaptorien tehtävänä on auttaa transkriptionaalisten aktivaattorien toimintaa. Adaptorit mahdollistavat aktivaattorien kiinnittymisen transkriptiokoneisoon, jolloin ne pystyvät toimimaan DNA:n säätelyalueiden kanssa ja siten vaikuttamaan transkription tehokkuuteen. (Bao ym. 2010: 821.)

Geenien ilmenemisen säätelijät ovat usein osana moniosaista kompleksia. SLK2 on osa LEUNIG (LUG) vaimentajakompleksia, joka koordinoi useita vaiheita kasvin alkion kehityksessä. Sillä on myös tärkeä merkitys embryogeneesissä, sillä transgeeniset kasvit, jotka eivät ilmennä SLK2:sta, jäävät kasvultaan vajavaisiksi. Kompleksi toimii auksiinin jakaantumisen säätelijänä, kasvin osien rajojen säätelijänä sekä kasvin kärkikasvupisteen kehityksessä. (Lee ym. 2014: 122.)

3 Menetelmät

Opinnäytetyön toteutuksen aikana käytettiin tunnettuja ja laajalti käytettyjä proteiinianalytiikan menetelmiä. Tuloksena saatiin semikvantitatiivista tietoa kasvatettujen kasvien tuottamien proteiinien määristä ja laadusta.

Opinnäytetyön aikana käytettyjä menetelmiä olivat transgeenisten kasvien kasvatus, segregatioanalyysi, proteasomi-inhibiittorikäsittely, proteiinien eristys sekä proteiinien erottelu ja analysointi SDS-PAGE:n ja immunoblottauksen avulla. Näiden menetelmien teoreettisen perustan lisäksi tämä luku käsittelee transgeenisten kasvien tuottoon käytettäviä yhdistelmä-DNA-tekniikan menetelmiä sekä tutkimuksessa käytettäviä proteiini-merkkejä ja vasta-aineita, jotka ovat oleellisia tutkittavien proteiinien löytämisessä.

3.1 Proteiinimerkit

Proteiinien tutkimiseen ja havainnointiin näytteistä on käytetty useita eri menetelmiä. Perinteisesti tutkittavat proteiinit on merkitty käyttäen radioaktiivisia isotooppeja tai fluoresoivia värejä. Tällöin tutkittavien proteiininäytteiden on pitänyt olla puhtaita. Merkkiproteiinin kiinnittäminen tutkittavaan proteiiniin yhdistelmä-DNA-tekniikan avulla on ollut suuri tekninen kehitysskaskel. Se mahdollistaa merkityn proteiinin havaitsemisen, mittaamisen ja puhdistamisen useita eri immunologisia metodeja käyttäen. (Harlow – Lane 1999: 348.)

3.1.1 Yhdistelmä-DNA-tekniikka

Yhdistelmä-DNA-tekniikka sai alkunsa 1970-luvulla, kun bakteereista onnistuttiin eristämään DNA:n tarkalleen tietystä kohdasta katkaisevia entsyymejä. Näitä entsyymejä kutsutaan nykyään restriktioentsyymeiksi. Toinen tärkeä keksintö samalta ajalta oli DNA-ligaasientsyymien löytö. Ligaatiolla tarkoitetaan DNA-jaksojen liittämistä takaisin yhteen. (Suominen ym. 2013: 66.)

Kolmas keksintö, joka mahdollisti yhdistelmä-DNA-tekniikan käytön, oli plasmidien käyttö DNA-vektoreina. Nyt voitiin haluttu geenijakso siirtää toisen eliön perimään. Haluttu siirrettävä geeni tai geenin osa pilkotaan erilleen jonka jälkeen se ja restriktioentsyymien avulla katkaistu plasmidi liitetään yhteen, jonka jälkeen vektori siirretään uuteen soluun, jolloin solun monistuessa sen tytärsolut perivät plasmidivektorin sisältämän uuden geeniaineksen. (Suominen ym. 2013: 67.)

Geenitekniikka mahdollistaa haluttujen proteiinien tuottamisen solussa siirtämällä haluttua proteiinia tuottava geeni tuottoisääntään käyttämällä ekspressiovektoria. Proteiinia koodaavan geenin lisäksi vektorissa tulee siirtää myös transkription ja mahdollisesti myös translaation säätelyalueita. Tämä on mahdollistanut vaikeasti eristettävien ja puhdistettavien proteiinien helpon tuoton. Lisäksi tätä tekniikkaa käytetään tuotettaessa yhdistelmäproteiineja, kuten tämän opinnäytetyön toteutuksessa käytettäviä proteiinimerkillä merkittyjä tutkimuksen kohteena olevia proteiineja. (Suominen ym. 2013: 78.)

Yhdistelmäproteiineja eli fuusioproteiineja tuotettaessa liitetään kohdeproteiinia koodaava geeni samaan lukukehykseen toista proteiinia koodaavaan geenin kanssa. Tällöin solun tuottaessa kohdeproteiinia, suoraan sen perään tuotetaan toinen proteiinijakso.

Tämä lisätty proteiinijakso on usein kohdeproteiinia helpommin havaittava tai eristettävä. Yhdistelmäproteiinin tuotto siis mahdollistaa sellaistenkin proteiinien havaitsemisen tai eristämisen, jotka olisivat muuten vaikeasti käsiteltävissä. (Suominen ym. 2013: 88.)

Tässä opinnäytetyössä käytettyjen kasvien genomiin on lisätty bakteerivektorin avulla tutkittavia proteiineja koodaaviin geeneihin Myc- tai HA-proteiinimerkkiä tuottava geeni. Tähän on käytetty floral-dip menetelmää, jossa arabidopsiskukinnot kastetaan liuoksessa, joka sisältää vektorina toimivia agrobakteereja, jotka kuljettavat halutut transgeenit kasvien sisään. Transgeenisten kasvien tuotto oli tehty jo ennen tämän opinnäytetyön aloittamista.

3.1.2 Proteiinimerkkien käyttö

Merkkiproteiinien käyttö rekombinaatiotekniikan avulla on tullut suosituksi, sillä aikaisemmista huolista huolimatta merkkiproteiinin lisääminen tutkittavaan proteiiniin ei yleensä vaikuta sen toimintaan. Lisäksi kehittyneet PCR-menetelmät ja oligonukleotidien synteesi sekä sopivien proteiinintuottovektorien runsaus ovat helpottaneet sen käyttöä. (Harlow – Lane 1999: 348.)

Proteiinimerkkejä käytetään pääasiassa kahteen tarkoitukseen. Proteiinien havaitsemiseen, joka mahdollistaa sen sijainnin, toiminnan ja ekspression seuraamisen sekä proteiinien puhdistamiseen, jossa käytetään hyväksi merkkiproteiinin kiinnittymistä liikkumattomaan ligandiin, jolloin proteiinin eristys solusta on yksinkertaista. (Harlow – Lane 1999: 349.)

Käytettäessä proteiinimerkkejä proteiinien tunnistukseen tulee ottaa huomioon ristireaktioiden mahdollisuus. Käytetyt vasta-aineet voivat kiinnittyä myös muihin solun sisältämiin proteiineihin, kuin vain haluttuun merkkiproteiiniin. Useat yleisesti käytetyt merkki-proteiinit sisältävät segmenttejä, joita on myös muissa tunnetuissa proteiineissa. (Harlow – Lane 1999: 349.)

Merkkiproteiinien käyttö on erityisen hyödyllistä silloin kun tutkittavalle proteiinille ei ole vielä kehitetty vasta-ainetta tai jos tutkittava proteiini on heikko antigeeni tai harvinainen. Tämä on yleinen käytäntö proteiinibiokemian tutkimuksessa. Koska merkkiproteiini ei ole varsinainen osa tutkittavaa proteiinia, sen tunnistamiseen käytettävät reagenssit ja

vasta-aineet eivät yhtä helposti vaikuta tutkittavan proteiinin toimintaan. (Harlow – Lane 1999: 349.)

Immunoblottaukseen käytettävät proteiinimerkit ovat tavallisesti epitooppimerkkejä. Ne ovat tavallisesti hyvin pienikokoisia, joten ne eivät vaikuta kohdeproteiinin biokemiallisiin toimintoihin yhtä todennäköisesti kuin esimerkiksi GFP-merkkiproteiini. On kehitetty suuri määrä erilaisia epitooppimerkkejä. Näistä yleisimmin käytetyt ovat Myc-merkki, HA-merkki sekä FLAG-merkki. (Harlow – Lane 1999: 352.)

Jos tutkittavia proteiineja varten ei ole olemassa käytettäviä vasta-aineita tai tutkittava proteiini on hyvin vaikeasti havaittavissa, proteiinin tunnistukseen käytetään proteiini-merkkiä, joka kiinnitetään proteiiniin rekombinanttitekniikan avulla. Käyttämällä bakteerivektoria, voidaan tutkittavaa proteiinia koodaavan geenin perään liittää merkkiä koodaava geenin palanen, jolloin transkription aikana tutkittavan proteiinin perään syntyy myös merkkiproteiini. Käytettyjä merkkejä vastaan on olemassa vasta-aineita, joiden perusteella voidaan tunnistaa myös tutkittavan proteiinin ekspressio. (Harlow – Lane 1999: 369.)

Tutkimuksessa käytettiin erityyppisiä arabidopsis-kasveja, joista osan geeniperimää oli muunneltu tietyn E3-ligaasin ekspression kannalta ja joista osa olivat tavallisia. Kasveihin oli siirretty agrobakteerivektorin avulla HA- tai Myc-merkkisekvenssit. Koska bakteerivektorin kiinnittämä merkki tarttuu satunnaisesti yhteen Arabidopsiksen viidestä kromosomista, mikä voi vaikuttaa geenin ilmenemiseen, seulottiin useita samanlaisia linjoja.

Tutkimuksessa proteiinien merkitsemiseen käytettiin kahta eri merkkiä, Myc- sekä HA-merkkiä. Niillä on omat kaupalliset vasta-aineensa, joiden perusteella niiden ekspressio voidaan tunnistaa immunoblottauksessa. Myc-merkki on todennäköisesti kaikkein yleisimmin käytetty proteiinimerkki. Sitä vastaan käytetään hiiren 9E10 monoklonaalista vasta-ainetta, jonka on osoitettu toimivan erityisen hyvin immunoblottauksessa. Myc-merkkiä käyttivät ensimmäisinä tutkijat Munro ja Pelham (1984), jotka myös osoittivat 9E10-vasta-aineen toimivuuden merkittyjen proteiinien tunnistuksessa. Vasta-aineen helppo saatavuus sekä Munron ja Pelhamin onnistunut tutkimus tekivät Myc-merkistä hyvin yleisesti käytetyn. (Harlow – Lane 1999: 353.)

Toinen tässä opinnäytetyössä käytetty proteiinimerkki oli HA-merkki. Se on saatu influenssaviruksen hemaglutiniiniproteiinista otetusta epitoopista. Ensimmäisenä HA-

merkkiä käyttivät Fieldin johtama tutkimusryhmä, jotka tuottivat sen merkitsemää proteiinia hiivassa ja eristivät sitä käyttäen 12CA5-vasta-ainetta. Sen jälkeen HA-merkkiä on käytetty onnistuneesti proteiinin eristämisen lisäksi myös proteiinien tunnistukseen soluvärjäyksessä, immunosaostuksessa, ELISA:ssa sekä immunoblottauksessa. (Harlow – Lane 1999: 354.)

3.2 Vasta-aineen valinta

Immunoblottauksessa käytettävän vasta-aineen valinta perustuu useaan eri seikkaan. Näitä on aviditeetti vasta-aineen ja antigeenin välillä, vasta-aineen valikoivuus antigeeniä kohtaan, antigeenin epitooppien muuntautuminen menetelmän aikana, miten helposti vasta-aine pääsee antigeenin luokse sekä valittu menetelmä ja sekundääristen reagenssien tyyppi. (Harlow – Lane 1999: 42.)

Koska vasta-aine tarttuu pieneen kohtaan antigeenissä, ristireaktion mahdollisuus tulee ottaa huomioon. Immunoblottauksessa antigeeneinä toimivat proteiinit ovat denaturoituneet ja epitooppina toimii lineaarinen aminohapposekvenssi. Tämän vuoksi on suuri mahdollisuus sille, että antigeeni tunnistaa toisissa proteiineissa samanlaisia aminohapposekvenssejä. Tämän vuoksi immunoblottauksessa ristireaktiot ovat tavallisia. Normaalisti vasta-aineen affiniteetti ristireaktion aiheuttamaa molekyyliä kohtaan ei ole yhtä voimakas kuin oikean kohdeantigeenin. Tämän takia korkean aviditeetin reaktioissa ristireaktion havainnointi on helpompaa kuin käytettäessä matalan affiniteetin vasta-aineita, kuten immunoblottauksessa usein tehdään. Koska immunoblottauksessa antigeenit eli kohdeproteiinit ovat jakautuneet koon perusteella, voidaan ristireaktion aiheuttava proteiini tunnistaa kohdeproteiinista sen koon mukaan. Ristireaktiot kertovat myös siitä, että kaksi eri antigeeniä jakavat samanlaisen domeenin, mikä viittaa niiden välillä olevaan jaettuun toimintaan tai evolutiiviseen sukulaisuuteen, joka voi olla tutkimuskäytössä hyödyllinen tieto. (Harlow – Lane 1999: 272.)

Immunoblottauksessa vasta-aineen valintaan ja sen onnistuneeseen käyttöön vaikuttavat antigeeneinä toimivien proteiinien denaturoituminen, antigeenien näkyvyys nitroseluloosamembraanilla ja vasta-aineen spesifisyys. Denaturoitumisen vuoksi ainoat käytettävissä olevat epitoopit ovat lineaarisia aminohapposekvenssejä. (Harlow – Lane 1999: 42.)

Immunoblottauksessa antigeenit ovat sijoittuneet nitroselluloosamembraanille niiden molekylaarisen painon perusteella. Tämän takia antigeenit ovat konsentroituneet pienelle alueelle. Tämä helpottaa vasta-aineen kiinnittymistä, verrattuna esimerkiksi nesteessä oleviin antigeeneihin. Sellaisetkin vasta-aineet, jotka kiinnittyvät heikosti antigeeniin, voivat olla tarpeeksi hyviä immunoblottaukseen. (Harlow – Lane 1999: 51.)

3.3 Transgeenisten kasvien kasvattaminen ja käsittely

Opinnäytetyössä käytettyjen kasvien kasvattamiseen ja käsittelyyn liittyvät työvaiheet kasvatusalustojen valmistuksesta siementen kasvatukseen ja proteasomi-inhibiittorikäsittelyyn.

3.3.1 Kasvatusalustojen valmistus

Laboratorioanalyysia varten kasvit kasvatetaan tavallisesti kiinteässä kasvumediassa kasvatusalustoilla. Yleisimmin kasvatusalustoilla käytetään Murashige & Skoog-mediaa (MS0), joka kehitettiin alun perin 1960-luvulla tupakan viljelyyn laboratoriossa tutkimuskäyttöön ja joka on ollut siitä asti käytetyin kasvumedia myös muiden kasvien kasvattamiseen laboratorio-olosuhteissa (Vasil – Thorpe 1994: 12). Murashige & Skoog-media sisältää paljon nitraattia, kaliumia ja ammoniaa sekä muita kasvin tarvitsemia mineraaleja (Misawa 1994).

Tämän lisäksi kasvumediaan lisätään sakkaroosia, joka toimii kasvin energianlähteenä. Sakkaroosi myös helpottaa osmoosia mediassa. Kasvumedian komponentit lisätään steriiliin veteen, jonka pH säädetään tarkasti halutuksi. Laboratorio-olosuhteissa kasvien pH säädetään riippuen kasvilajista. Oikean pH:n saavuttaminen kasvatusolosuhteissa on tärkeää sillä se vaikuttaa ravinteiden liukoisuuteen ja siten kasvin kykyyn vastaanottaa ravinteita (Argo 2003: 1). Liian matala pH myös estää median myöhemmän kiinteytymisen.

Kasvumedian kiinteäksi tekemiseen käytetään yleensä kasviagaria. Agarin lisäämiseen jälkeen media lämmitetään, jotta agar liukenee. Lämpimänä media on vielä nestemäistä,

mutta se kiinteytyy jäähtyessään. Kasvatusalustoille kaatamisen jälkeen median annetaan jäähtyä kiinteäksi, jonka jälkeen ne ovat valmiita viljelyyn. Kasvatusalustoille voidaan lisätä muita aineita, kuten antibiootteja, mutta se tulee tehdä siinä vaiheessa kun media on vielä nestemäistä.

3.3.2 Siementen sterilisointi

Ennen viljelyä siemenet voidaan steriloida. Steriloinnin tarkoituksena on varmistaa, ettei siementen mukana tule muita mikrobeja, etenkin sieniä, jotka voisivat vaikuttaa kasvien kasvuun ja kehittymiseen. Siemenet steriloidaan tavallisesti käyttämällä klooria (sodium hypochlorite), joka tappaa siementen pinnalla olevat mikrobit. Ennen kloorikäsittelyä siemenet voidaan käsitellä myös etanolilla. Liian pitkä etanolikäsittely kuitenkin tappaa siemenet niiden kovasta pinnasta huolimatta. Steriloinnin jälkeen siemenet tulee pestä steriilissä vedessä ennen niiden viljelyä. (Sauer – Burroughs 1986: 745.)

3.3.3 Siementen viljely

Siemenet viljellään kasvatusalustoille yksitellen tarpeeksi kauas toisistaan. Viljelyn tulisi tapahtua mahdollisimman steriilissä tilassa, kuten laminaarivirtauskaapissa. Viljelyn jälkeen kasvatusalustat tulee sulkea teipillä kontaminaatioiden välttämiseksi. Siemenet voidaan viedä kylmähuoneeseen ainakin parin päivän ajaksi. Tämän tarkoituksena on simuloida talven olosuhteita ja tehostaa niiden itämistä, kun ne otetaan kylmästä pois. Siemenet itäisivät muutenkin mutta kyseinen toimenpide saa aikaan ainakin teoriassa synkronoidumman itämisen. Tämän jälkeen kasvatusalustat viedään kasvuhuoneeseen, jossa kasvit kasvavat keinovalossa. Kasvuhuoneessa säädellään päivänpituutta eli sitä, kuinka paljon kasvit saavat valoa vuorokauden aikana.

3.3.4 Proteasomi-inhibiittori-käsittely

Proteasomi-inhibiittorikäsittelyn tarkoituksena on vertailla kasvinjoiden proteiini-ekspression tasoja ja siten tutkittavan proteiinin stabiiliutta silloin kun kasvimateriaali on käsitelty proteasomi-inhibiittorilla ja ilman sitä. Tällöin voidaan arvioida onko tutkittava proteiini epästabiili ja proteasomien aiheuttaman hajoamisen kontrolloimaa. Yksi käytettävissä

oleva kaupallinen proteasomi-inhibiittori on MG-132, joka estää 26S proteasomikompleksin toiminnan ja siten estää proteolyttistä toimintaa soluissa. (HelloBio 2016.)

3.4 Proteiinien eristys

Kasvinäytteistä tulee eristää niiden sisältämät proteiinit, ennen kuin niiden analysointi on mahdollista. Proteiinien eristykseen on useita eri menetelmiä. Niihin liittyy tyypillisesti kasvisolujen hajotus (solulyysi) detergentti-pohjaisten liuosten avulla. Lisäksi hajotukseen käytetään usein mekaanista menetelmää esimerkiksi huumareen ja survimen avulla. Kasvien soluseinän muodostavien selluloosan ja polysakkaridien tensiilin vahvuuden takia tämä on nopein ja tehokkain keino kasviproteiinien erottamiseen. (Thermo Fisher.)

Eristyksen aikana tulee pyrkiä välttämään näytteiden proteiinien hajoamista niin paljon kuin mahdollista. Näytteet tulisi pitää tämän vuoksi kylmässä eristyksen aikana. Käytetty puskuri myös osaltaan ylläpitää proteiinien stabiiliutta. Jos halutaan tutkia proteiinien välisiä vuorovaikutuksia tai niiden immunoreaktioita, tulisi puskurin olla sellainen, että se säilyttää proteiinin aktiivisuuden (Lijing ym. 2010). Puskurin tulee myös ylläpitää samaa pH:ta kuin proteiinien alkuperäisessä ympäristössä. Muut puskurissa olevat aineet voivat esimerkiksi stabiloida lysosomaalisia membraaneja tai estää oksidaation aiheuttamia vahinkoja näytteissä. (European Molecular Biology Laboratory.)

3.4.1 Proteiinien eristys kasveista

Kasvisolujen proteiinipitoisuus on tyypillisesti pienempi kuin muiden eukaryoottisolujen. Muista eukaryooteista eroten niiden massa ei ole proteiineja vaan muita makromolekyyliä kuten polysakkarideja ja fenolisia polymeerejä (Roe, 2001: 136). Kasvisolujen vahvat soluseinät tekevät niiden mekaanisesta ja kemiallisesta hajotuksesta vaikeampaa verrattuna eläinsoluihin (Thermo Fisher).

Proteolyysi voi olla ongelma proteiinien onnistuneessa eristyksessä, etenkin matalamman proteiinipitoisuuden vuoksi. Solun hajottaminen rikkoo sen sisäisen tasapainon, joka johtaa solunsisäisten proteaasien ja fosfataasien säatelemättömään toimintaan (Thermo fisher). Proteolyysin estämiseen käytetään yleensä eristyksessä käytettyyn reagenssiseokseen lisättävää proteaasi-inhibiittoria. Ennen inhibiittorin valintaa tulisi huo-

mioida eristykseen käytettävän näytteen proteaasien tyyppi. Esimerkiksi seriini-proteaasi, jonka pitoisuus on korkea eläinsoluissa, on kasvisoluissa harvinaisempi. Siksi käytettävien proteaasi-inhibiittorien toiminta näytteessä tulisi tarkistaa parhaan tuloksen saamiseksi. (Roe, 2001: 137.)

3.5 Proteiinien konsentraation mittaaminen

Ennen kuin proteiinit erotellaan SDS-PAGE:n, tulee varmistaa, että kaikkien pipetoitavien näytteiden absoluuttinen proteiinimäärä on yhtä suuri. Tähän käytetään Bradfordin menetelmää, joka perustuu spektrofotometriaan. (Rice University, 1995.)

Näytteet laimennetaan, jonka jälkeen ne pipetoidaan kuoppalevyille. Jokaiseen näytteeseen lisätään Bradfordin reagenssia, jossa oleva Coomassie Blue muodostaa näytteessä olevien proteiinien kanssa sinisen värin, jonka intensiteetti on suoraan verrannollinen näytteessä olevan proteiinin määrään. Tämän jälkeen absorbanssi 595 nanometrin alueella mitataan spektrofotometrin avulla. (Rice University, 1995.)

Saadun arvon avulla lasketaan, mikä on näytteen proteiinikonsentraatio. Tässä käytetään apuna standardikäyrää, jossa näytteiden absorbanssi verrataan aiempaan, tunnettuun proteiinikonsentraatioon ja sen absorptioon. Tuloksesta tulee vielä vähentää taustan (puskurin ilman proteiinia) absorbanssi. Konsentraation perusteella voidaan päättää, kuinka paljon näytettä käytetään SDS-PAGE:a varten (tavallisesti jokaisessa näytteessä tulisi olla 5-20 mikrogrammaa proteiinia). (Rice University, 1995.)

3.6 SDS-PAGE

Geelielektroforeesi on menetelmä, jota käytetään makromolekyylien erotteluun. Se perustuu kaikkien varauksellisten molekyylien tapaan liikkua sähkökentässä. (Scitable, 2014.)

Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi eli SDS-PAGE on menetelmä, jonka tarkoituksena on erottaa näytteessä olevat proteiinit vain ja ainoastaan niiden koon perusteella tulevaa tunnistusta varten. Aminohappojen tertiäärinen ja kvater-

näärisen rakenteen vuoksi ne liikkuvat geielektroforeesissa niiden kolmiulotteisen rakenteen sekä varauksen mukaan. Täten proteiinit, joissa on sama määrä aminohappoja, voivat liikkua geelissä eri matkan samassa jännitteessä samalla aikavälillä riippuen niiden rakenteesta. Toisaalta erikokoiset proteiinit voivat liikkua myös saman matkan, jolloin ne voidaan sekoittaa toisiinsa. SDS-PAGE:ssa halutaan proteiinit denaturoida, jolloin ne säilyttävät vain primäärisen aminohapporakenteen eli ne ovat suorassa ketjussa. (Davidson College, 2001.)

Natriumdodekyylisulfaatti eli SDS on detergentti, joka kykenee avaamaan hydrofobisia molekyylien sidoksia, mutta siinä on myös negatiivinen varaus. Proteiinit jotka inkuboidaan SDS:ssä menettävät kolmiulotteisen rakenteensa ja saavat saman suuruisen negatiivisen varauksen. Tällöin proteiinit liikkuvat kohti positiivista napaa sähköisessä kentässä. SDS-PAGE:ssa käytetään myös muita aineita proteiinien valmisteluun. β -merkaptoetanoli pilkkoo proteiinien disulfidirakenteita. Näyteputkia keitetään ainakin kymmenen minuutin ajan täydellisen denaturaation varmistamiseen. (Rice University, 1996.)

SDS-käsittelyn jälkeen proteiinit pipetoidaan omille paikoilleen polyakryyliamidigeeliin, joka koostuu akryyliamidipolymeeristä. Akryyliamidi sekoitetaan bisakryyliamidin kanssa, jotka muodostavat yhdessä polymeeriverkon kun siihen lisätään polymerisoiva agenttina toimivaa ammoniumpersulfaattia (APS). Tämän lisäksi käytetään TEMED:iä (N,N,N,N'-tetrametyleenidiamiini), joka katalysoi polymerisaatioreaktiota edistämällä APS:än vapaiden radikaalien tuottoa. Akryyliamidin ja bisakryyliamidin määrien suhde ja niiden kokonaiskonsentraatio geelissä vaikuttavat siihen miten huokoista geeli on. Geelin huokoisuus vaikuttaa siihen minkä kokoisia proteiineja geelissä voidaan erottaa (Thermo Fisher). SDS-PAGE:en käytetty geeli koostuu kahdesta osasta. Sen yläosaa kutsutaan peitegeeliksi ja alaosaa erotusgeeliksi. Proteiinit eivät vielä erotu peitegeelissä vaan sen tehtävänä on koota proteiinit erotusgeelin yläosaan. Tällöin ne siirtyvät erotusgeelille samanaikaisesti. Proteiinien erottelu tapahtuu vasta erotusgeelillä. (Suominen ym. 2012.)

Tiivistyessään geeli muodostuu verkkomaisesta rakenteesta, jonka läpi proteiinit voivat kulkea, kun niiden läpi johdetaan sähköinen virta. Koska proteiineilla on SDS-käsittelyn jälkeen sama sähköinen varaus, ne liikkuvat geelin lävitse samalla nopeudella. Pienemmät proteiinit pystyvät kuitenkin liikkumaan geelin verkkomaisen rakenteen lävitse nopeammin kuin isommat proteiinit. Saman kokoiset proteiinit pystyvät liikkumaan samassa

ajassa saman etäisyyden, jolloin ne muodostavat geeliin vyöhykkeen. Geelielektroforeesin jälkeen pystytään geelissä havaitsemaan vyöhykkeitä eri kohdissa proteiinien kulke-
maa reittiä. Saman kokoiset proteiinit ovat jakautuneet omiin vyöhykkeisiinsä. SDS-
PAGE:n jälkeen voidaan proteiinit paikantaa käyttäen erilaisia värjäyksiä. Jos vyöhykkei-
den paikannuksessa ja proteiinien tunnistuksessa halutaan käyttää vasta-aineita, tulee
proteiinit siirtää nitroselluloosakalvolle immunoblottausta varten. (Solunetti 2006.)

Jos näytteessä on kaksi eri proteiinia, jotka ovat saman kokoisia, ne ovat kulkeutuneet
samaa vyöhykkeeseen. Tämä voi johtaa siihen että ne sekoitetaan toisiinsa. Tässä
opinnäytetyössä proteiinien tunnistus perustuu spesifien vasta-aineiden käyttöön joten
tämä ei koidu ongelmaksi.

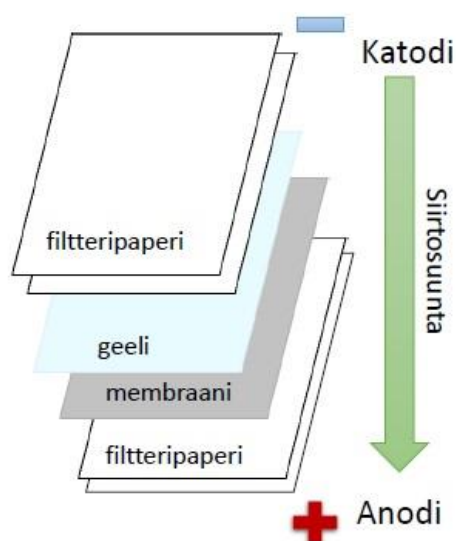
3.7 Western Blot

Western Blot tai immunoblottaus on tärkeä solu- ja molekyylibiologiassa käytetty analy-
simenetelmä, jonka avulla voidaan tunnistaa näytteessä olevat proteiinit spesifisten
vasta-aineiden avulla. Ennen Western Blottingin käyttöä tulee proteiinit erotella toisis-
taan geelielektroforeesin avulla. Western Blot muistuttaa DNA:n hybridisaatiomenetel-
mää, jonka kehitti alun perin vuonna 1975 tutkija nimeltään Southern. Menetelmä nimet-
tiin keksijänsä mukaan Southern Blottingiksi. Myöhemmin samankaltainen menetelmä
kehitettiin RNA:n tunnistamiseksi, jota kutsutaan Northern Blottingiksi. Western Blot, joka
kehitettiin vasta myöhemmin, nimettiin näiden aiempien menetelmien mukaan. (Harlow
– Lane 1999: 270.)

Immunoblottausta voidaan käyttää aina kun halutaan selvittää tietyn proteiinin esiintymi-
nen ja määrä näytteessä tai polypeptidin suhteellinen molekyyliaino. Immunoblottaus
on erityisen hyödyllinen menetelmä kun tutkittavat proteiinit ovat vaikeasti merkittävässä
tai helposti hajoavia. Koska eri proteiinit ovat konsentroituneet pienelle alueelle blottaus-
sessa, myös sellaiset vasta-aineet, jotka tarttuvat käytettäviin antigeeneihin heikosti,
ovat käyttökelpoisia (Harlow – Lane 1999: 42).

Immunoblottauksen onnistumiseen vaikuttaa vasta-aineiden tunnistaman epitoopin
laatu. Immunoblottausta edeltävä geelielektroforeesi denaturoi näytteen proteiinit, jonka
takia vain tietyt vasta-aineet voivat tunnistaa ne. Monet monoklonaliset vasta-aineet
tunnistavat kohdeproteiinin niiden kolmiulotteisen rakenteen takia, minkä vuoksi ne eivät
ole käyttökelpoisia immunoblottauksessa. (Harlow – Lane 1999: 271.)

Kun proteiinit on eroteltu toisistaan koon perusteella käyttäen elektroforeesia, ne tulee vielä siirtää erilliselle kiinteälle membraanille ennen kuin voidaan käyttää vasta-aineita niiden tunnistamiseen. Membraani on tavallisesti nitroselluloosaa tai PVDF-kalvoa. Proteiinien siirtoa geeliltä membraanille kutsutaan elektroblottaukseksi. Nitroselluloosakalvo sekä geeli laitetaan puristuksiin kasettiin ja upotetaan puskuriin kahden elektrodin väliin. Elektrodien väliin johdettava sähkövirta saa geelissä olevat proteiinit siirtymään nitroselluloosamembraanille. (Wilson ym. 2005: 293.)



Kuvio 3. Elektroblottauksen periaate.

Käytetyn membraanin ominaisuuksien takia proteiinit tarttuvat helposti kiinni siihen. Tämän takia tutkittavien proteiinien siirron jälkeen tulee membraani käsitellä siten, ettei siihen enää tartu ylimääräisiä proteiineja. Tämä "blokkauk" tapahtuu inkuboimalla membraania maidossa tai naudan seerumin albumiinissa (BSA). Tällöin kaikki membraanit vapaut, hydrofobiset sitoutumiskohdat peittyvät. (Wilson ym. 2005: 293.)

Vasta-aineena käytetään proteiinille spesifistä vasta-ainetta, joka tarttuu proteiiniin kiinni muodostaen sen kanssa kompleksin. Western blottingissa käytetään primääriin vasta-aineen lisäksi toista, sekundääristä vasta-ainetta vasta-ainereaktion visualisoimisen hel-

pottamiseksi. Sekundäärinen vasta-aine tarttuu kiinni primääriin vasta-aineeseen. Sekundäärinen vasta-aine on leimattu entsyymillä, joka mahdollistaa vasta-aineen visualisoinnin membraanilta. (Wilson ym. 2005: 293–295.)

Vasta-aineen detektioon voidaan käyttää useita eri menetelmiä. Tavallisimmassa detektiomenetelmässä membraani inkuboidaan substraattissa, joka tarttuu kiinni entsyymiin ja muodostaa sen kanssa kromogeenisen presipitaatin. Tarkempaan lopputulokseen päästään kun käytetään tehostettua kemiluminesenssia (enhanced chemiluminescence, ECL). Tässä menetelmässä käytetty entsyymi, piparjuuriperoksidaasi (horseradish peroxidase) reagoi vetyperoksidin ja luminolin, joka on kemiluminesenssisubstraatti, läsnäollessa ja oksidoi luminolin, joka alkaa tuottaa valoa. Tuotettu valo voidaan havaita kaappaamalla se radiografiselle filmille. (Wilson ym. 2005: 421.)

Primäärin vasta-aineen valinta riippuu siitä, mikä antigeeni on tunnistettavassa proteiinissa, ja mitä vasta-aineita kyseiselle antigeenille on saatavissa. Sekundäärinen vasta-aine tarvitaan, sillä primääri vasta-aine ei yleensä ole suoraan havaittavissa. (Wilson ym. 2005: 416.)

3.8 Coomassie-värijäys

Western Blottingin jälkeen geelit voidaan käsitellä Coomassie-blue-reagenssilla. Geeliin on immunoblottauksenkin jälkeen vielä jäänyt osa proteiineista, joihin reagenssi pystyy kiinnittymään. Värin sulfonihapporyhmät kiinnittyvät proteiinien positiivisiin amino-ryhmiin ionisidoksilla käyttäen Van der Waals-voimaa (National diagnostics, 2011). Tuloksena syntyy sinistä väriä. Sininen väri muodostaa juovan siinä kohdassa missä proteiininäyte on kulkeutunut geelielektroforeesin aikana geelin yläosasta alaosaan. Värin intensiteetti on suoraan verrannollinen geelissä olevan proteiinin pitoisuuteen ja siten myös alkuperäisen näytteen pitoisuuteen.

Geelien Coomassie-värijäystä käytetään tässä opinnäytetyössä Western Blottingin laadunvarmistukseen ja proteiininäytteen onnistumisen arviointiin. Kaikkien samaan geeliin pipetoitujen proteiininäytteiden tulee olla pitoisuudeltaan mahdollisimman lähellä toisiaan, jotta immunoblottauksen tulokset olisivat mahdollisimman vertailukelpoisia. Geelien värijäyksiä arvioidaan silmämääräisesti. Geeliin muodostuneiden juovien tulisi olla saman vahvuisia. (Welinder – Ekbländ, 2011: 1416.)

Eri vahvuiset juovat voivat johtua useasta eri asiasta. Puutteet pipetointitekniikassa voivat johtaa epätasaiseen lopputulokseen. Huolimaton pipetointi voi myös johtaa näytteiden osittaiseen vuotoon viereisiin näytekohtiin tai siihen että osa näytteestä ei mene oikeaan kohtaan. Vaikka pipetointitekniikassa ei olisikaan vikaa, voi epätasainen konsentraatio johtua muistakin tekijöistä. Proteiinikonsentraation mittausta varten tehdyt Bradford-mittaukset voivat antaa epätarkan arvon, joka johtaa siihen, että pipetoidaan väärä määrä näytettä. Jos huolimattoman proteiinieristyksen takia näytteeseen jää kasvidebriksen hiukkasia, ne vääristävät spektrofotometriaan perustuvan Bradfordin mittauksen tulosta. Myös mittaukseen käytettävän kuoppalevyn huolimaton käsittely voi jättää kyvettien pohjaan sormenjälkiä tai muita tahroja, jotka voivat vääristää tulosta.

Jos jokin immunoblottaukseen käytettävistä näytteistä on proteiinipitoisuudeltaan suurempi, se johtaa immunoblottauksessa voimakkaampaan ekspressioon, ja siten tekee tuloksista vähemmän vertailukelpoisia.

4 Tutkimuksessa käytetyt kasvit

4.1 Arabidopsis thaliana

Tutkimusryhmä käyttää tutkimuksen kohteena *Arabidopsis thaliana*-kasvia. Sitä käytetään yleisesti malliorganismina tutkittaessa kasvien geenejä ja niiden toimintaa. Osana tämän opinnäytetyön toteutusta kuuluu geenimuunneltujen *arabidopsis*-kasvien kasvatusta ja niiden proteiinintuoton analysointi.

Arabidopsis thaliana eli lituruoho on pieni, ruohovartinen ristikukkaiskasvi, jonka elinkierto on yhden vuoden mittainen. Se on läheistä sukua esimerkiksi kaalille ja rypsilille. *Arabidopsis*in rakenteesta huolimatta sillä on samantyyppiset solut ja kasvinosat kuin puuvartisillakin kasveilla. Lisäksi sen genomi on pääosin samanlainen kuin muillakin kasveilla. Eri kasvien DNA:n emäsjärjestyksen ja niiden samankaltaisten elintoimintojen vuoksi *arabidopsisista* käytetään mallikasvina ja sen geenitutkimuksesta on hyötyä myös muiden kasvien tutkimuksessa. Koska kasvien geeniluokat ovat suurelta osin yhteneviä, niiden diversiteetti perustuu suurelta osin siihen, miten eri geeniluokat ovat organisoituneet ja miten geenien säätely kasvisoluissa tapahtuu. (Helariutta 2002: 173.)

Arabidopsiksen pienen koon, helpon käsittelyn ja lyhyen elinkierron takia siitä tuli suosittu tutkimuksen kohde laboratorio-olosuhteissa 1960-luvulta lähtien. Sen genomi määriteltiin vasta 40 vuotta myöhemmin 2000-luvun alussa. Se oli ensimmäinen kasvi jonka perimä määriteltiin kokonaisuudessaan. Arabidopsiksen genomi koostuu viidestä pienikokoisesta kromosomista. Sen perimä on 140 Mb:n pituinen ja sillä on noin 25 000 geeniä. (National Science Foundation 2002.) Verrattuna muihin kasveihin, sen perimä on hyvin pienikokoinen. Se johtuu osaltaan siitä, että arabidopsiksen genomilla ei ole paljoakaan toistojaksoja, vaan geenit on pakattu melko tiiviisti ja niissä on vain pienet introviosuudet. Proteiineja koodaavien segmenttien suuri osuus ja toistojaksojen vähyys helpottavat geneettistä analyysiä sekä sekvensointia ja tekevät osaltaan arabidopsiksesta hyvän malliorganismien. (Hartwell ym. 2004.) Arabidopsikseen kohdistuvien tutkimusten suuri määrä ja sen geneettistä tietoa säilövien nettisivujen laajuus saa aikaan sen että arabidopsiksesta löytyvää tietoa on helposti tutkijoiden saatavilla. Myös suuri määrä mutanttilinjoja on tutkijoiden saatavilla. (The Arabidopsis Information Resource.)

Arabidopsiksen valintaan malliorganismiksi johtivat useat syyt. Arabidopsis kasvaa aikuiseksi noin kuudessa viikossa. Se tuottaa suuren määrän siemeniä ja se kykenee pölyttämään itse itsensä. Sen perimä on diploidinen, joka tekee sen perimän resessiivisten mutaatioiden analyysistä helppoa. Tästä ominaisuudesta on hyötyä tässä opinnäytetyössä segregaatioanalyysin aikana, kun halutaan seuloa transgeeni-insertioiltaan homotsygoottisia linjoja. Arabidopsiksen genomia on helppo muokata käyttämällä agrobakteereja vektoreina. Arabidopsis on kasvina helppohoitoinen, se tarvitsee selviytyäkseen vain vettä, vähän mineraaleja ja hieman valoa. (Koch ym. 2007: 934).

4.2 Kasvilinjat

Proteiinianalyysi tehtiin usean eri linjan kasveille. Samasta linjasta käytettiin useampia kasveja, jotta todennäköisyys sille että ainakin yhdessä geeni-insertio olisi onnistunut halutulla tavalla ja kasvi olisi tulevissa tutkimuksissa käyttökelpoinen.

Tutkimuksessa käytettiin taustaltaan kahta eri tyyppiä olevia kasveja. Columbia (Col-0) on villityyppi, jonka käyttö on hyvin tavallista eri tutkimuksissa. Se on myös ensimmäinen Arabidopsis thalianan tyyppi, jonka genomi sekvensoitiin kokonaisuudessaan. Toinen käytetty tyyppi on e3a-linja, joka on yksi käytettävissä oleva mutanttilinja. Siinä on mutaatio E3a:ta koodittavassa geenissä, joka johtaa siihen että sen E3a-aktiivisuus on huomattavasti vähäisempi kuin Col-0-linjassa.

Käytetyt transgeeniset linjat ovat usealla eri tavalla muokattuja. Erilaisen taustan lisäksi niissä vaihteli käytetty proteiinimerkki, deleetio tai ekspressioon vaikuttava käytetty vektori. Vektori tuottaa kohdeproteiiniin yliekspression kahdella tavalla riippuen käytetystä vektorista. pBA002_Myc- ja pBA002_HA-vektorit tuottavat jatkuvan ektooppisen yliekspression (35S-kontrolloitu ekspressio) niiden kohdeproteiinissa, jonka seurauksena rekombinantti-DNA tuottaa sen koodaamaa proteiinia kaikissa kudoksissa jatkuvasti sen sijaan että se olisi tarkasti säädelty prosessi. Nämä vektorit myös tuottavat insertoiduissa kasveissa basta-resistenssin. Basta eli glufosinaatti-ammonium on kasvimyrkky, joka tavallisesti johtaisi arabidopsiksen kuolemaan kasvatusalustalla. Transgeenisten kasvien resistenssi sitä vastaan mahdollistaa geeni-insertion onnistumisen seulonnan kasvateista kasveista. pER10_HA-vektori tuottaa myös kohdeproteiinissa ektooppisen yliekspression mutta vain silloin kun β -estradiolia on lisätty (XVE-kontrolloitu ekspressio). Vektori tuottaa myös resistenssin kanamysiinille. (Bilicka 2016.)

Osassa linjoja käytetään myös Δ DDK-deleetiota, joka tarkoittaa sitä että ARR-proteiineja (*Arabidopsis response regulator*) koodaavista geeneistä on poistettu kokonaan niiden signaalin vastaanottava osa (signal receiving domain). Tämän osan uskotaan vaikuttavan ARR-proteiinien stabiiliuteen. Tietävästi se myös ohjailee ARR-proteiinien aktivaatiota sytokiniinien toimesta. Tätä deleetiota käytetään tässä tutkimuksessa koska halutaan tutkia ARR1:n stabiiliutta ja E3a:n vaikutusta siihen. (Bilicka 2016.)

Osaan kasveista oli siirretty Δ E3aINT-mutaatio (E3a-INTeracting), jossa E3a:n kiinnittymiseen vastaavaan proteiinalueeseen on tehty pistemutaatioita, joiden paikat on tehty perusteltujen arvausten perusteella. Mutaatioiden tässä osassa uskotaan vaikuttavan heikentävästi E3a:n toimintaan. (Bilicka 2016.)

Alla olevaan taulukkoon on listattu kaikki eri tutkittavat kasvinlinjat, niiden ominaisuudet taustan ja insertion suhteen sekä seikat, joita halutaan tulevaisuudessa kyseisiltä linjoilta tutkia. Taulukkoon on myös merkitty missä sarjassa kyseisen insertiolinjan kasvit analysoidiin.

Taulukko 1. Tutkittavat kasvinlinjat.

konstrukti	tavoitteet
ARR1/pBA002_Myc/ Col-0 (1. sarja)	ARR1:n yliekspressio Columbia-tyypin kasveissa ei ole osoitettu tuottavan fenotyyppisiä muutoksia ilman ylimääräisen sytokiniinin lisäämistä. Kasvien fenotyypeissä voidaan kuitenkin havaita muutoksia silloin kun käytetyissä kasveissa on E3a-ligaasin koodaavan geenin mutaatio. Oletuksena onkin että E3a osallistuu tavallisesti aktivoituneen ARR1:n hajottamiseen, jolloin kasvin kehittämisessä ei tapahdu suuria muutoksia siitä huolimatta että ARR1:stä ekspressoituu normaalia suurempia määriä. Tilanteessa, jossa E3a ei toimi mutaation takia normaalisti, se ei pysty hillitsemään ARR1:en yliekspressiota, jolloin ARR1 vaikuttaa kasvin kehittymiseen ja siten myös sen fenotyyppiin.
ARR1/pBA002_Myc/ <i>E3a1-6</i> (1. sarja)	
ARR1ΔDDK/pBA002_Myc/ Col-0 (2. sarja)	Tämän deleetion on osoitettu aiheuttavan sytokiniinivasteen ilman sytokiniinin lisäystä. Tämä tarkoittaa sitä että ARR1 on koko ajan aktiivinen. Deleetion uskotaan myös tekevän proteiinista epästabiilimman, mahdollisesti E3a:n vaikutuksesta. Tällöin tämän linjan pitäisi olla stabiili tilanteessa, jossa E3a:n geeni on mutatoitunut eikä ligaasi ekspressoitunut normaalisti.
ARR1ΔDDK/pBA002_Myc/ <i>e3a</i> (2.sarja)	

ARR1ΔE3aINT/pBA002_Myc/e3a (2. sarja)	Mutaatio E3a:n sitovassa osassa tulisi teoriassa stabiloida ARR1:n vieläkin tehokkaammin.
E3a wt/pBA002_HA/ Col-0 (3. sarja)	E3-ligaasin yliekspressio uskotaan johtavan vastakkaiseen reaktioon, kuin sen ekspression hiljentäminen. Esimerkiksi E3a:n villin tyypin yliekspressio johtaisi ARR1:n aktiivisuuden laskuun ja siten myös sytokiniinivasteen laskuun. Näitä linjoja voitaisi käyttää myös muihin tutkimuksiin.
E3a dn/pBA002_HA/ Col-0 (3. sarja)	
E3a wt/pBA002_HA/ e3a (3. sarja)	Linja on muuten samanlainen kuin kaksi edellistä paitsi että siinä käytetään kasvia, jossa on mutatoitunut E3a. Linjaa voitaisi käyttää samanlaisiin tutkimuksiin kuin edellistä kahta linjaa mutta ilman natiivin E3a:n promoottorin transkriptiosäätelyn vaikutusta.
SLK2/pBA002_Myc/ Col-0 (2. sarja)	SLK2:n yliekspression vaikutuksista ei ole aikaisempaa tietoa, mutta aikaisemman kirjallisuuden perusteella muutoksia voitaisi etsiä embryon, taimen tai kukan kehityksestä.
E3b/pBA002_HA/ Col-0 (3. sarja)	E3b:n yliekspression pitäisi tuottaa vastakkainen vaikutus kuin sen säätelämän proteiinin yliekspressio. Aiemmin julkaistujen tutkimusten mukaan E3b:n on osoitettu vaikuttavan tiettyjen signaaliteiden säätelyyn. Tätä linjaa voidaan käyttää myös tutkittaessa kyseisten responssien eroa verratuna esimerkiksi villiin tyyppiin ja muihin mutantteihin.

4.2.1 Kahden konstruktin linjat (dd-linjat)

Yhden insertion sisältävien kasvien lisäksi käytettiin linjoja, joihin oli lisätty kaksi toisistaan erillistä insertiota. Tämä tapahtui kastamalla käytetty kasvi kahteen eri agrobakteeri-liuokseen. Insertioiden avulla kiinnitettyjen proteiinimerkkien avulla voidaan tutkia sekä E3-ligaasin että sen hypoteettisen kohdeproteiinin ekspressiota kasvilla.

Insertioihin käytettiin eri tyyppin vektoreita, jotka vaikuttivat insertioiden kohdeproteiinien yliekspressioon eri tavalla. Koska E3-ligaaseihin liitettyjen proteiinimerkkien vektorina käytettiin pER10_HA-vektoria, voidaan ligaasin yliekspressio käynnistää β -estradiolikäsitteilyllä. Tällöin voidaan yliekspression vaikutuksia seurata mittaamalla ligaasin kohdeproteiinin pitoisuus immunoblotauksen avulla käyttäen hyväksi kohdeproteiiniin liitettyä proteiinimerkkiä. Kaikki kahden konstruktin linjat analysoitiin neljännessä sarjassa. (Bilicka 2016.)

Taulukko 2. Tutkittavat kahden konstruktin kasvinlinjat.

dd	konstrukti	tausta	tavoitteet
dd1	E3awt/pER10_HA	Col-0	Riippuen kasvilla olevan E3-ligaasin tyypistä, kohdeproteiinin mutaatiosta ja käytetyn kasvin taustasta, odotettu tulos on erilainen. Esimerkiksi double negative-tyypin ligaasin ei pitäisi yliekspressoitunakaan tuottaa muutoksia. Ennen kuin näiden linjojen kasvit ovat käyttökelpoisia, tulee kumminkin insertion segregatio tarkistaa erikseen. Nämä kaksi kertaa agrobakteerissa kastetut linjat on merkitty lyhenteellä dd (double dip).
	ARR1/pBA002_Myc		
dd2	E3awt/pER10_HA	e3a	
	ARR1/pBA002_Myc		
dd3	E3awt/pER10_HA	Col-0	
	ARR1ΔDDK/pBA002_Myc		
dd4	E3awt/pER10_HA	e3a	
	ARR1ΔDDK/pBA002_Myc		
dd5	E3adn/pER10_HA	Col-0	
	ARR1/pBA002_Myc		
dd6	E3adn/pER10_HA	e3a	
	ARR1/pBA002_Myc		
dd7	E3adn/pER10_HA	Col-0	
	ARR1ΔDDK/pBA002_Myc		
dd8	E3adn/pER10_HA	e3a	
	ARR1ΔDDK/pBA002_Myc		
dd9	E3b/pER10_HA	Col-0	
	SLK2/pBA002_Myc		

4.2.2 Kontrollit ja muut näytteet

Analysoitavien kasvinäytteiden lisäksi käytetään myös luotettavalle analyysille välttämättömiä kontrolleja ja proteiini-markkeria. Kolmannessa sarjassa käytettiin HA-GST-kontrolleja (merkitty +HA), joka on bakteerin tuottama rekombinanttiproteiini. Se on yleisesti käytössä oleva kontrolli proteiinimerkkejä varten ja se saatiin toiselta samassa kampuksella työskentelevältä tutkijalta. Muissa sarjoissa käytettiin ARR1/pBA002_Myc/e3a -linjan kasvia, joka oli jo aiemmin todettu positiiviseksi (merkitty +Myc). Negatiivisina kontrolleina käytettiin col-0 ja e3a -linjojen kasveja, joihin ei ollut siirretty DNA-insertiota (merkitty col ja e3a).

Jotta geelielektroforeesin erottamia proteiinien koot voitaisiin tunnistaa, tulee elektroforeesissa käyttää proteiini-markkeria. Proteiini-markkerit ovat sekoituksia, joissa on useita erikokoisia proteiineja. Geelielektroforeesissa markkerin proteiinit asettuvat tietyille paikoille aiemmin tunnetun kaavan mukaisesti. Koska markkerin proteiinien koot tunnetaan jo aiemmin, voidaan muiden näytteiden proteiinien koot arvioida vertaamalla niitä markkerin proteiineihin. Proteiini-markkerit ovat usein jo valmiiksi värjättyjä, joten ne näkyvät valmiissa geelissä ilman muuta käsittelyä. Tässä tutkimuksessa käytettiin kaupallista PageRuler Plus Prestained Protein Ladder-markkerituotetta.

5 Toteutus

Opinnäytetyön toteutukseen kuului useita vaiheita, jotka toteutettiin tutkimusryhmän käyttämien työohjeiden mukaan. Toteutuksen vaiheet olivat seuraavat; kasvualustojen valmistus, siirtogeenisten kasvien siementen keräys, sterilointi ja viljely, segregaatioanalyysi, kasvinäytteiden keräys ja säilöntä jäädyttäen, proteiinien eristys ja proteiinikonsentraation mittaaminen, proteiinien erottelu SDS-PAGE:n avulla sekä Western Blot-menetelmä, jonka avulla kasvin tuottamat proteiinit analysoitiin. Opinnäytetyön toteutus suoritettiin aikavälillä marraskuu 2015 – helmikuu 2016. Toteutuksen lisäksi samana kahden viikon aikajaksolla suoritettiin bioanalytiikan tutkintoon kuuluvan työharjoittelun samassa tutkimusryhmässä.

Tässä luvussa käydään läpi tutkimuksen aikana tehdyt työvaiheet. Menetelmien taustalla olevaa teoriaa ei enää käydä läpi. Lisäksi tässä luvussa käydään läpi tutkimuksessa käytetyt erilaiset kasvilinjat ja niiden geneettiset ominaisuudet.

5.1 Kasvilinjojen kehitys ja valinta

Tutkimuksessa käytettiin useita geneettisesti muunneltuja kasvilinjoja. Geenimuuntelu suoritettiin ennen opinnäytetyön aloitusta. Käytetyt kasvit (taustaltaan joko Col-0 tai e3a) kastettiin agrobakteeriliuokseen käyttäen floral dip-menetelmää. Siirrettyä DNA:ssa on useita funktionaalisia osia. Halutun proteiinin lisäksi siinä on säätelyalue sekä kasvimyrryille tai antibiootille resistentin tuottava alue, joka koodaa kasvimyrryiltä suojaavia proteiineja. Tämän jälkeen kastettujen kasvien siemenet lasketaan T1-sukupolveen. Pieni osa siemenistä on geneettisesti muunnelluita (primäärit transformantit).

Kastaminen voi tuottaa useita erilaisia lopputuloksia. Yhteen kromosomiin voi siirtyä yksi tai useampi kappale siirrettävää DNA:ta. Useampaan kuin yhteen kromosomiin voi siirtyä DNA:ta tai DNA voi siirtyä molempiin kasvin sukusoluista. Tutkimukseen halutaan vain sellaisia kasveja, joihin agrobakteeri on siirtänyt vain yhden kappaleen DNA:ta jompaankumpaan sukusoluun, joka myöhemmin muodostaa zygotin toisen sukusolun kanssa, johon ei ole insertiossa siirtynyt DNA:ta. Tällöin syntyneestä siemenestä tulee taimi, jonka jokaisessa solussa on vain yksi kappale siirrettyä DNA:ta yhdessä sen kromosomissa, eli kasvi on heterotsygootinen.

Onnistuneen bakteerivektori-insertion jälkeen kasvit ovat resistenttejä kasvatusalustoille lisätyille antibiooteille (kanamysiini) tai kasvimyrryille (basta) riippuen siitä millaista vektoria on käytetty. Normaalisti arabidopsis-kasvit eivät selviäisi itämisvaihetta pidemmälle käytettyjen antibioottien ja kasvimyrryjen takia. Transgeenisten kasvien resistenssiä käytetään hyväksi kun kasvatetuista kasveista valitaan ne, joissa vektorin insertio oli onnistunut ja jotka siten ovat selviytyneet. On helpompaa tehdä valinta resistenssin mukaan sen sijaan että jouduttaisiin selvittämään haluttua proteiinia koodaavan geenin sekvenssi kasveista.

Onnistuneen geneettisen modifikaation sisältämät siemenet seulotaan kasvatusalustoilta ja istutetaan multaan siementen saantia varten. T1-kasveista ei vielä tiedetä onko

niihin siirtynyt yksi vai useampi DNA-insertio. Niiden tuottamista siemenistä, jotka kuuluvat T2-sukupolveen voidaan määrittää insertioiden lukumäärä segregaatioanalyysin avulla. Tässä tutkimuksessa käytetyt siemenet kuuluvat tähän ryhmään.

5.2 Kasvatusalustojen valmistus

Kasvien kasvualustat valmistettiin käsin. Kasvualustojen mediaan käytettiin Murashige & Skoog-mediaa. Alustojen pH:ksi säädettiin 5,7 kaliumhydroksidin (1M KOH) avulla. Kasvatusmedia autoklavoitiin ennen käyttöä, jonka jälkeen mediaa käsiteltiin vain lamiinaarivirtauskaapissa, jotta voitiin välttää kontaminaatiot. Kasvualustojen valmistukseen liittyvät työvaiheet tehtiin muutenkin steriileissä olosuhteissa. Kasvatusalustoille lisättiin lisäksi antibioottia (kanamysiini, 50 µg/ml) ja kasvimyrkkyä (basta, 10 µg/ml) tulevaa segregaatioanalyysiä varten. Antibiootilla ja kasvimyrkkyllä kyllästettyjä alustoja varten valmistettiin ylimääräiset kasvatusalustat negatiivista kontrollia varten. Kasvatusalustat säilytettiin jääkaappilämpötilassa viljelyyn asti.

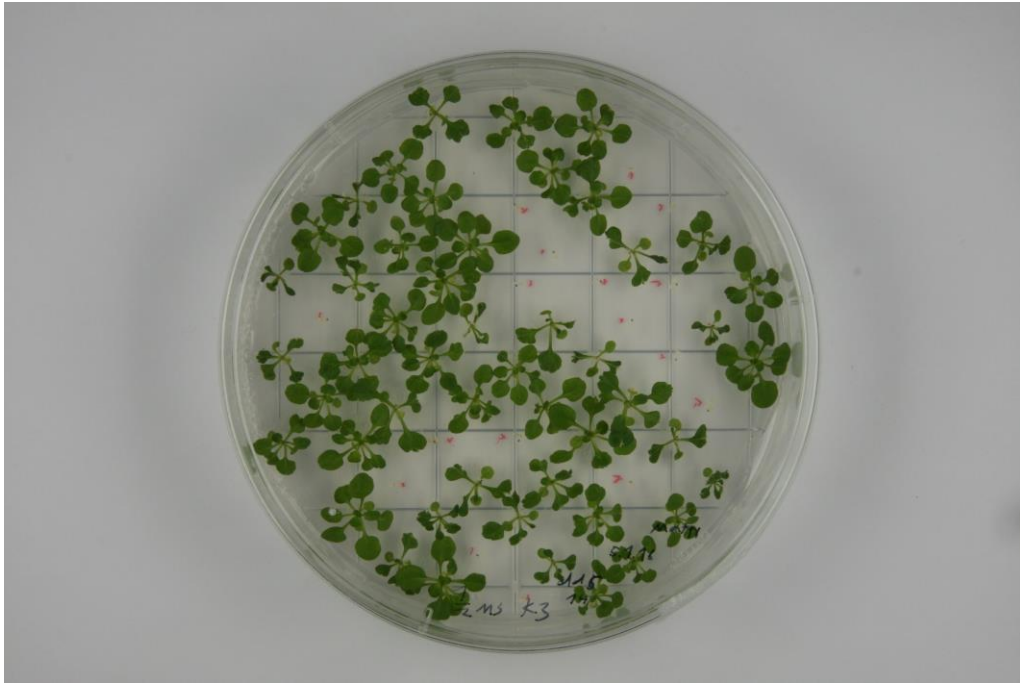
5.3 Sterilointi

Käytettävät siirtogeeniset kasvit oli kerätty ja kuivatettu jo ennen opinnäytetyön alkamista. Kunkin kasvilinjan siemenet oli laitettu erilleen kangaspusseihin, joissa siemenet olivat sterilisaation ajan. Siemeniä steriloitiin ensin 70 % etanolissa kahden minuutin ajan. Tämän jälkeen ne steriloitiin kloorissa (0,5 M sodium hypochlorite) kymmenen minuutin ajan. Sitten siemenet vielä pestiin steriilissä vedessä minkä jälkeen ne olivat valmiit viljeltäviksi.

5.4 Viljely

Siemenet viljeltiin kasvatusalustoille yksitellen tarpeeksi kauas toisistaan. Jokaista kasvatusmediaerää varten viljeltiin myös ylimääräisiä villin tyyppin siemeniä erilliselle kasvatusalustalle, jotta voitaisiin varmistaa käytetyn kanamysiinin ja bastan toimivuus. Ilman tätä varmistusta myös kasvit ilman resistenssiä selviäisivät jos käytetty antibiootti ei toimisi, mikä tekisi segregaatioanalyysistä mahdottoman.

Viljelyn jälkeen kasvatusalustat suljettiin teipillä ja vietiin kylmähuoneeseen pimeään kahden päivän ajaksi (kasvien kylmäkäsittely). Tämän jälkeen kasvatusalustat vietiin kasvuhuoneeseen kasvamaan kolmen viikon ajaksi. Huoneessa käytetty päivänpituus (fotoperiodi) oli kuudentoista tunnin päivä ja kahdeksan tunnin yö.



Kuvio 4. Kuva kasvatusalustasta, johon oli lisätty kanamysiiniä. Osan kasveista voi nähdä kuolleen pian itämisen jälkeen eli niissä ei ollut resistanssin antavaa transgeeniä.

5.5 Segregaatioanalyysi

Segregaatioanalyysin avulla voidaan arvioida DNA-insertioiden määrää kasvinlinjassa. Tarkoituksena on hakea sellaisia transgeenisia kasveja, joissa on vain yksi insertio yhdessä kromosomissa. Myöhemmin näistä kasveista saadaan homotsygoottisia linjoja, joita voidaan käyttää tutkimuksissa. Tilanteessa, jossa linjan kasviin on siirtynyt yksi DNA-insertio, joka on yhdessä diploidisen kasvin kromosomissa kiinni, voidaan ajatella että insertio on "dominoiva alleeli" ja toisen kromosomin alue, johon insertiota ei tullut on "resessiivinen alleeli". Laboratorio-olosuhteissa kasvi lisääntyy vain pölyttämällä itsensä jolloin meioosin aikana alleelit jakaantuvat kasvin jälkeläisiin Mendelin periytymissääntöjen mukaan. Jos merkitään "alleelia" eli insertiota kirjaimella A, kasvin tuottamista siemenistä puolella on alleelit Aa, neljäsosalla AA ja neljäsosalla aa. Jos siemenessä on yksikin insertio, se pystyy selviytymään kasvatusalustaan lisäystä antibiootista/kasvi-

myrkystä. Tämä tarkoittaa sitä että kasvi, jossa on vain yksi DNA-insertio, tuottaa siemeniä, joista kolme neljäsosaa selviytyvät selektiomaljalla kasvatettuina ja yksi neljäsosa kuolee.

Jokaisesta kasvatetusta linjasta laskettiin kasvien selviytymisprosentit ja katsottiin, sopivatko niiden siementen selviytymisprosentti 25 %. Jokaiselle maljalle pyrittiin viljelemään tarpeeksi siemeniä, että tällainen tilastollinen analyysi olisi mahdollisimman luotettavaa. Analyysiin käytettiin χ^2 -testiä, jonka arvon tuli olla vähemmän kuin 3,84, jotta linjan voidaan ajatella sisältävän yhden insertion. Käytännössä χ^2 -testi toimii siirtämällä alla olevaan kaavaan selviytyneiden versojen määrä ja odotettujen versojen määrä (75 %). Tämän jälkeen lasketaan saman kaavan mukaan oikeasti ja teoriassa selviytyneet versot ja lasketaan saadut arvot yhteen. Tuloksena on χ^2 -arvo.

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{selviytyneet versot} - \text{odotetut versot})^2}{\text{odotetut versot}}$$

Kuvio 5. χ^2 -testi.

Dd-linjat seulottiin ensin basta-alustalla ja sitten kanamysiini-alustalla eli kummankin konstruktin insertio seulottiin erikseen. Seulonta oltaisi voitu tehdä myös alustalla, jossa on sekä basta että kanamysiiniä, mutta se olisi vaatinut monimutkaisempia tilastollisia menetelmiä.

Tutkittaessa geenimuunneltuja kasveja on riskinä se, että havaittu fenotyyppin muutos johtuu siitä että insertio on estänyt jonkin toisen geenin toiminnan asettumalla juuri sen kohdalle perimässä. Tämän takia tulisi käyttää ainakin kahta saman linjan kasvia, joihin insertio on osunut eri kohtaan perimää ennen kuin tuloksia voidaan pitää luotettavina.

5.6 Proteasomi-inhibiittorikäsittely

Proteasomi-inhibiittorikäsittelyn tarkoituksena on estää proteiinien hajoaminen proteasomin toimesta. Tarkoituksena oli seurata proteiinin stabiiliutta ja inhibiittorin vaikutusta proteiinien kertymiseen, minkä takia samasta kasvulinjasta yksi näyte käsiteltiin inhibiittorilla ja toinen jätettiin käsittelemättä.

MG-132 käsittelyä varten valmistettiin samanlainen media kuin kasvatusalustoja varten mutta ilman agaria. Liuokseen lisättiin inhibiittoria liuotettuna dimetyylisulfoksidiin (DMSO). Käytetty pitoisuus oli 50 μ M. Kasvatusalustoilta poistetut kasvit upotettiin kokonaan liuokseen. Jokaisesta linjasta otettiin ainakin kolme taimea niiden koon mukaan. Tavoitteena oli että kasvimateriaalia olisi yhtä paljon joka näytteessä. Negatiiviset kontrollit käsiteltiin liuoksessa, jossa oli dimetyylisulfoksidia ilman proteaasi-inhibiittoria. Näin haluttiin varmistaa että mahdollinen reaktio johtui proteaasi-inhibiittorista eikä esimerkiksi nestemäisestä mediasta tai liuottimena käytetystä dimetyylisulfoksidista.

Käsittely MG-132:ssa tai kontrolliliuoksessa kesti noin 3-4 tuntia. Suuren näytemäärän takia immersioaikaa ei pystytty pitämään vakiona. Proteasomi-inhibiittorikäsittelyyn käytetty aika on tavallisesti kahden ja neljän tunnin välissä ja lisäksi tämän tutkimuksen tarkoituksena ei ole vertailla proteiinikertymän tasoa eri linjojen välillä käsittelyn jälkeen, vaan vaihtelua saman linjan käsitellyn ja käsittelemättömän näytteen välillä, minkä takia vaihtelevat immersioajat eivät haittaa.

Immersion jälkeen kasveista poistettiin ylimääräinen kosteus talouspaperin avulla. Tämän jälkeen kunkin linjan kasvit siirrettiin koeputkeen, jotka säilöttiin pakastimeen -70 c asteessa proteiinien eristystä varten.

5.7 Proteiinien eristys

Proteiinien eristys tehtiin tutkimusryhmän käyttämän työohjeen mukaan kokonaisista, -70 asteessa säilytetyistä kasvinäytteistä. Koeputkissa olleet jäädytetyt kasvit murskattiin ja hienonnettiin muovisen survimen avulla käyttäen nestemäistä typpeä. Proteiinien hajoamisen välttämiseksi näyteputkia säilytettiin työvaiheiden aikana jäissä ja työvaiheet suoritettiin mahdollisimman nopeasti ilman taukoja. Mekaanisesti murskattuun kasvimassaan lisättiin valmistettua puskuria, jonka jälkeen kasveja hienonnettiin vielä lisää, jotta puskuri ja näyte sekoittuisivat ja jotta massassa olisi mahdollisimman vähän isoja kappaleita.

Tätä opinnäytetyötä varten tehdyssä eristyksessä käytettiin puskuria, joka perustui aiemmassa tutkimuksessa (Lijing ym. 2010) käytettyyn puskuriin, jota tutkimusryhmä muokasi omaan tarkoitukseensa sopivaksi. Käytetty puskuri oli tris-pohjainen (tris(hydroksi-

metyyli)aminometaani). Siinä oleva β -merkaptetoetanol hajottaa proteiinien sidoksia ja toimii antioksidanttina. Triton X-100 vähentää pintajännitystä ja edistää solukalvoproteiinien eristystä. Lisäksi puskuriin oli lisätty proteaasi-inhibiittoria.

Kasvimassan hajotuksen jälkeen putket sentrifugoitiin. Supernatantti, johon kaikki näytteessä olevat proteiinit olivat siirtyneet, siirrettiin varovaisesti uusiin putkiin. Tulevaa SDS-PAGE:a varten näytteet käsiteltiin natriumdodekyyilisulfaatilla, joka denaturoi proteiinien tertiäärisen rakenteen. Lisäksi näytteitä keitettiin kymmenen minuutin ajan denaturaation valmistamiseksi. Näytteisiin lisättiin vielä glyserolia ja väriä tulevaa näytteiden geeliin pipetointia varten. Putket säilytettiin pakastimessa 20 asteessa.

5.8 Proteiinipitoisuuksien mittaust

Ennen geelielektroforeesia ja Western Blottingia näytteistä tuli määrittää niiden proteiinipitoisuus spektrofotometrisesti. Pipetoitaessa näytteet geelielektroforeesia varten, niiden konsentraation tulisi olla yhtä suuri, jotta tulokset olisivat vertailukelpoisia. Tämän vuoksi proteiinikonsentraatio mitataan ennen geelielektroforeesia, jotta jokaista näytettä voidaan käyttää oikea määrä.

Proteiinien konsentraation mittaukseen käytettiin Bradfordin menetelmää. Siinä jokaisesta mitattavasta näytteestä tehtiin laimennos, joka pipetoitiin kuoppalevyille. Tässä tutkimuksessa käytettiin 1:5 laimennoksia. Näytteeseen lisättiin Bradfordin reagenssia, joka muodosti näytteen proteiinin kanssa sinisen värin. Näytteen absorbanssi mitattiin 595 nm:ssä spektrofotometrin avulla. Saadun arvon avulla laskettiin, mikä on näytteen proteiinikonsentraatio. Apuna käytettiin standardikäyrää, jossa näytteiden absorbanssia verrattiin aiempaan, tunnettuun proteiinikonsentraatioon ja sen absorptioon. Tässä opinnäytetyössä käytettiin käyrää, jonka mukaan absorbanssiarvo 1,00 vastaa 8 mikrogramman proteiinikonsentraatiota näytteessä. Tuloksesta vähennettiin vielä taustan (puskurin ilman proteiinia) absorbanssi. Konsentraation perusteella päätettiin, kuinka paljon näytettä käytetään SDS-PAGE:a varten (tavallisesti jokaisessa näytteessä tulisi olla 5-20 mikrogrammaa proteiinia).

5.9 Western Blot

SDS-PAGE:a varten valmistettiin omat geelit, joiden akryyliamidipitoisuus oli 10 %. Näytteet sekä kontrollit pipetoitiin geeliin ja eroteltiin, kunnes ne olivat erottuneet ja alimmat proteiinit olivat kulkeutuneet koko matkan geelin yläosasta geelin alaosaan. Aluksi käytettiin 400 mA:n ja 70 voltin jännitettä, kunnes näytteet olivat kulkeutuneet peitegeelin läpi erotusgeeliin. Tämän jälkeen jännite vaihdettiin 120 volttiin.

Seuraavaksi valmistettiin elektroblottausta varten "voileipä", jonka avulla proteiinit siirrettiin geeliltä membraanille. Primaarin vasta-aineen valinta riippui siitä mitä proteiinimerkkiä oli käytetty kohdeproteiinissa. Membraaneja inkuboitiin yön yli. Seuraavana päivänä ne käsiteltiin sekundäärisellä vasta-aineella sekä kemiluminisenssilla aineella, jonka jälkeen ne voitiin kuvata pimeähuoneessa.

Yhden Western Blottingin suorittamiseen meni kolme päivää. Kaikkien näytteiden tekemiseen meni neljä kertaa, minkä lisäksi tehtiin ylimääräinen viides Western Blot, jossa analysoitiin aikaisemmista blottauksista niitä näytteitä, joiden tulos oli epäselvä. Yhden Western Blottingin tekoon meni siis viikko, joista kolme päivää meni itse blottaukseen ja kaksi muuta päivää seuraavien näytteiden proteiinieristykseen ja näytteiden valmisteluun.

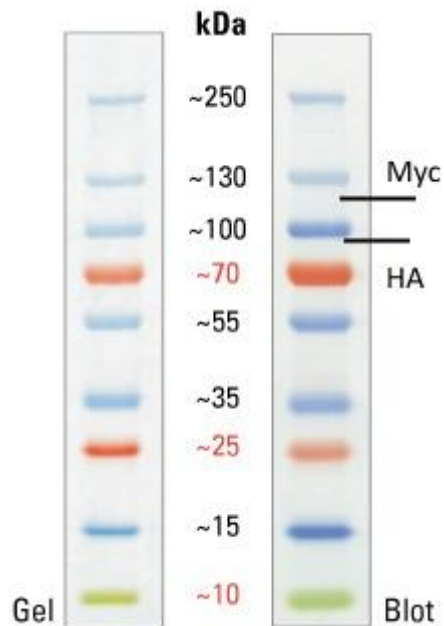
6 Tulokset ja arviointi

Tehtyjen immunoblottausten tulosten perusteella voitiin arvioida DNA-insertion onnistuneisuutta kasvinlinjoissa ja linjojen käyttökelpoisuutta tulevilla tutkimuksilla. Kustakin linjasta arvioitiin halutun rekombinanttiproteiinin pitoisuutta kasvissa. Tulokset ovat semikvantitatiivisia ja rekombinanttiproteiinin ekspresion tasoa on kuvattu kolmitasoisella asteikolla. Proteiinin ekspresio oli joko heikkoa, keskivahvaa tai vahvaa. Rekombinanttiproteiinin ekspresio immunoblottauksessa kertoo siitä, että geenin insertio oli onnistunut. Proteiinien ekspressiota tarkasteltiin 25 minuutin valotuksen jälkeen. Lyhyemmät valotukset kertoivat siitä, miten esimerkiksi ekspresion taso vaihtelee MG132-käsittelyn jälkeen. Joistain linjoista voitiin nähdä ekspressiota kahden tunnin valotuksen jälkeen, mutta näin heikkoa ekspressiota ilmaisevat linjat eivät ole käyttökelpoisia jatkotutkimuksiin.

Etsittävät rekombinanttiproteiinit ovat erikokoisia, joten ne näkyvät eri kohdassa membraania. Membraanilla olevien proteiinien kokoa voidaan arvioida käytetyn markkerin avulla. Markkeri on piirretty blottausten kuvien päälle.

Taulukko 3. Proteiinikonstruktioiden koot, joiden perusteella ne voidaan tunnistaa membraanilta.

rekombinanttiproteiini	koko (kD)	huomautuksia
ARR1-5Myc	88	-5Myc-merkityt rekombinanttiproteiinit nähdään noin 25 kD isompina proteiineina tuntemattomasta syystä. Ilman Myc-merkkiä ARR1 on 75 kD kokoinen.
ARR1ΔE3aINT-5Myc	88	
ARR1ΔDDK-5Myc	72	
E3awt-3HA	83	
E3adn-3HA	83	
SLK2-5Myc	104	
E3b-3HA	47	
HA-GST (pos. kontrolli)	26	



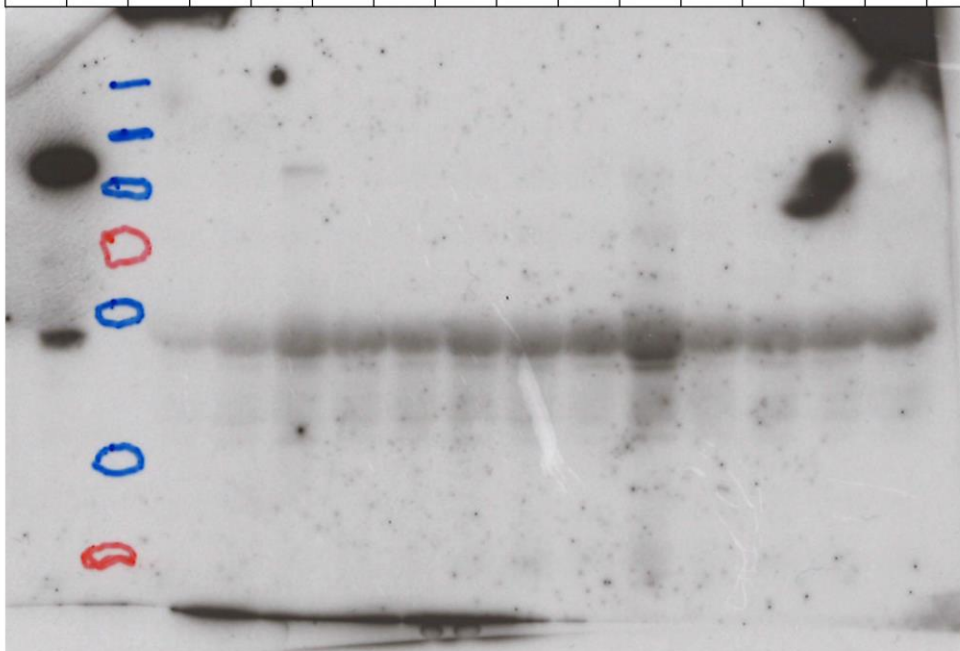
Kuvio 6. Tutkimuksessa käytetty markkeri, johon on merkitty mihin kohtaan tietyllä proteiinimerkillä merkitty konstrukti näkyy membraanissa. Lähde: ThermoFisher.com

6.1 Ensimmäinen sarja

Immunoblottauksen tulokset on esitetty viidessä sarjassa. Yhdellä sarjalla tarkoitetaan yhtä blottauskertaa, johon kuuluu yhteensä neljä blotattua membraania. Yhdellä membraanilla on tilaa 15 näytteelle, johon kuuluu myös käytetyt kontrollit ja markkeri. Viides sarja poikkeaa muista siten, että siihen kuuluu vain kolme blotattua membraania.

Ensimmäisessä sarjassa analysoitiin linjoja ARR1/pbA002_Myc/Col-0 ja ARR1/pbA002_Myc/e3a. Kumpikin konstrukti on ektooppisesti yliekspressoiva ARR1-proteiinin suhteen, jolla ei ole merkitystä tässä analyysissä, mutta mikä on tutkimusryhmän tekemien jatkotutkimusten suhteen tärkeää. Käytetty proteiinimerkki on Myc. Mycin ja ARR1:sen muodostama rekombinanttiproteiini voidaan havaita membraanin yläosassa, silloin kun näyte ekspressoi positiivisesti. Linjan nimen loppuosa kertoo siitä, mitä taustaa transgeeniset kasvit ovat alun perin olleet. Col-0 on villityyppi kun taas e3a on E3a:n ekspresion suhteen epänormaali kasvi.

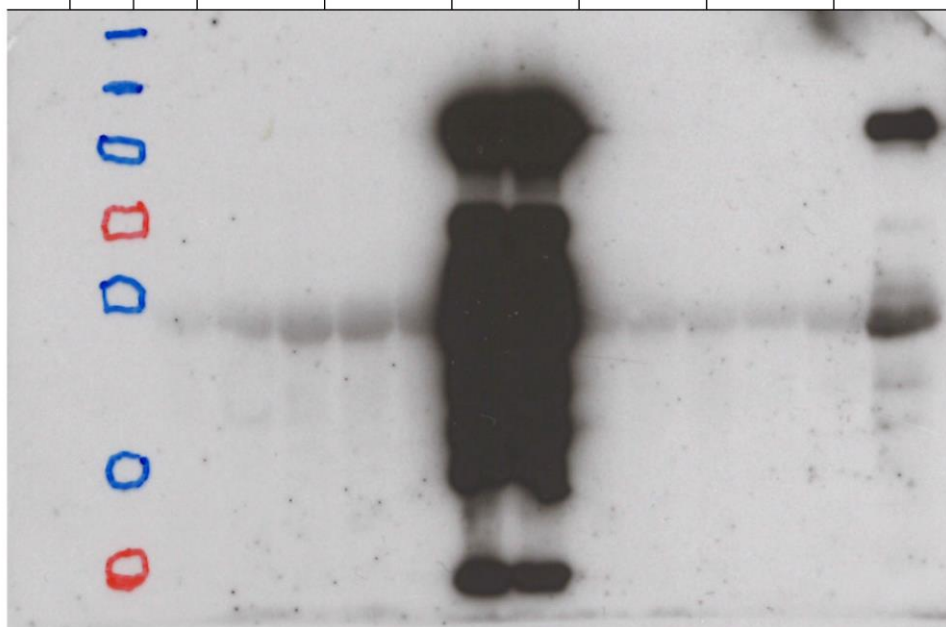
WB 1			ARR1/pBA002_Myc/Col-0												GM plant		
			1			2			6		7		8		10		line no.
+Myc	L	COL1	07.01			07.02			07.03		07.04		07.05		07.06		tube no.
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132
3	3	8,5	13,3	11,5	9,4	8,8	9,9	9,4	8,7	15,8	10,2	11,1	10,9	10,2			vol. (µl)



Kuvio 7. Ensimmäisen sarjan ensimmäinen blottaus.

Ensimmäisessä blottauksessa kaikki näytteet kontrollia lukuunottamatta olivat negatiivisia. Membraanin keskivaiheilla näkyvät raidat ovat epäspesifistä taustaa, joka näkyy kaikissa analysoitavissa näytteissä. Linjassa 1 näkyvä piste ja linjassa 10 näkyvä kuvio eivät ole proteiiniekspressiota.

WB 2			ARR1/pBA002_Myc/Col-0												GM plant
			34		11		12		13		15		17		line no.
+Myc	L	COL1	07.07		07.08		07.09		07.10		07.11		07.12		tube no.
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132
3	3	8,5	8,8	6,6	10,1	8,0	7,8	8,3	8,0	6,4	7,4	6,3	9,8	9,5	vol. (μl)
							vahva						keskivahva		

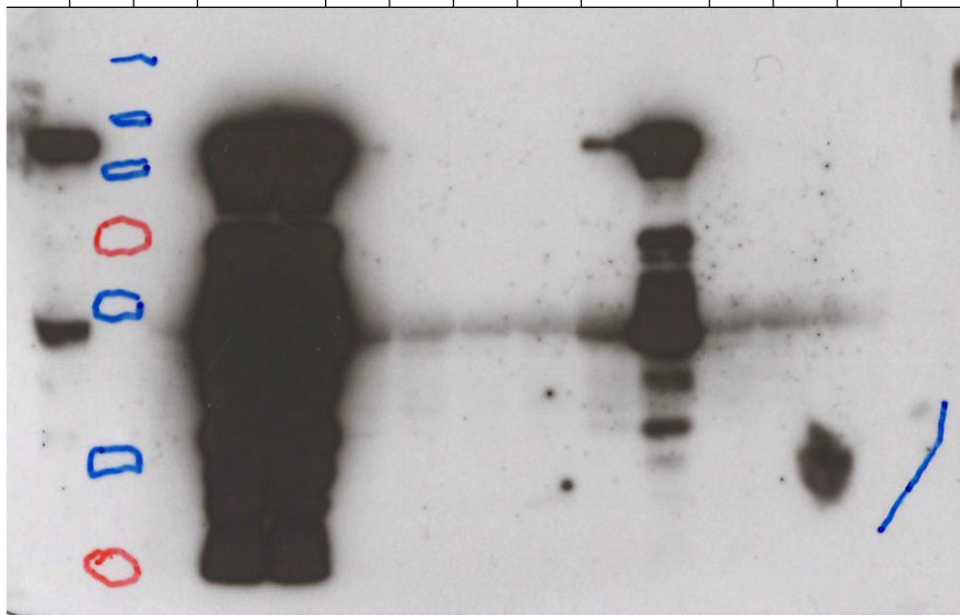


Kuvio 8. Ensimmäisen sarjan toinen blottaus.

Toisessa blottauksessa näkyivät ensimmäiset positiiviset näytteet, linjat 12 ja 17. Ekspressoituva proteiini näkyy membraanin yläosassa (katso luvun alussa oleva proteiini-markkerin kuva ja siihen merkityt proteiinien kohdat), linjan alaosassa oleva ekspressio johtuu taas hajonneesta proteiinista.

Blottauksessa ei näkynyt positiivista kontrollia, eikä kyseisellä linjalla näkynyt edes kaikilla muilla linjoilla näkyvää epäspesifistä taustaa. Tämä voi johtua esimerkiksi membraanin kuivumisesta jossain blottauksen vaiheessa tai siitä ettei ECL-liuos levinnyt kunnolla koko membraanin alueelle. Koska samalla blotilla nähtiin positiivisia tuloksia, voidaan blotin kuitenkin olettaa toimivan. Lisäksi tarkasteltaessa käytettyä geeliä, nähtiin että kontrolli oli ainakin pipetoitu. Tilanteessa, jossa yhtäkään positiivista tulosta ei ole eikä positiivista kontrolliakaan näy, ei voida tietää onko vain kontrolli toimimaton, vai onko koko sarja epäonnistunut.

WB 3			ARR1/pBA002_Myc/Col-0												GM plant
			18		20		24 or 26		24 or 26		27		29		line no.
+Myc	L	COL1	07.13		07.14		07.15 ('15A')		07.16 ('15B')		07.79		07.80		tube no.
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132
3	3	8,5	11,2	11,1	7,2	8,2	7,5	8,8	6,6	8,3	15,5	9,8	18,4	8,0	vol. (µl)
			vahva						keskivahva						

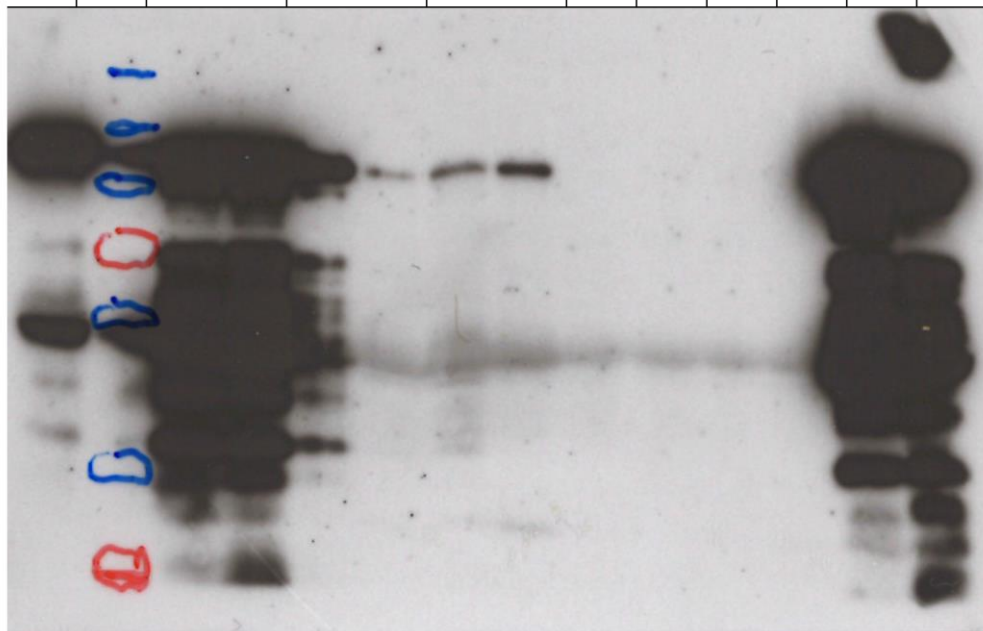


Kuvio 9. Ensimmäisen sarjan kolmas blottaus.

Kolmannessa blotissa linjassa 29 ei näkynyt edes epäspesifistä taustaa. Jotta voitaisiin varmistaa onko näyte oikeasti negatiivinen, se tehtiin uudestaan viidennessä sarjassa. Linjassa 20 näkyi taas hyvin heikko ekspressio, jota ei voida ottaa tuloksissa huomioon. Membraanissa näkyi myös epämääräisiä pisteitä ja kuvioita, jotka eivät ole ekspressiota.

Kasvien keräysvaiheessa huomattiin, että kahteen kasvatusalustaan oli kumpaankin merkitty numero 15 ja että numero 16 puuttui. Tämän takia ei voida olla varmoja kumpi tutkittavista näytteistä kuuluu 24 ja kumpi linjaan 26. Tämän takia näytteet on merkitty myös 15A ja 15B. Toinen linjoista (merkitty 15B) oli positiivisesti ekspressoitunut. Samasta blottauksesta linja 18 oli myös vahvasti positiivinen.

WB 4		ARR1/pBA002_Myc/										GM plant		
		Col-0		e3a										
		30		2		5.6								
+Myc	L	07.81		07.35		07.36		COL1		e3a1		1Cβ1		tube no.
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132
3	3	10,1	11,3	8,6	10,2	16,2	10,4	12,3	8,5	7,8	7,3	10,2	7,7	vol. (μl)
		vahva		heikko		heikko								



Kuvio 10. Ensimmäisen sarjan neljäs blottaus.

Neljännessä blottauksessa saatiin useita käyttökelpoisia linjoja. Näitä olivat linjat 30, 2, ja 5.6. Neljännessä blottauksessa käytettiin myös proteiini-inhibiittorin kontrollia, joka merkittiin 1Cβ1. Kontrollin yläpuolella oleva kuvio ei ole ekspressiota.

Taulukko 4. Yhteenveto ensimmäisen sarjan positiivisista linjoista.

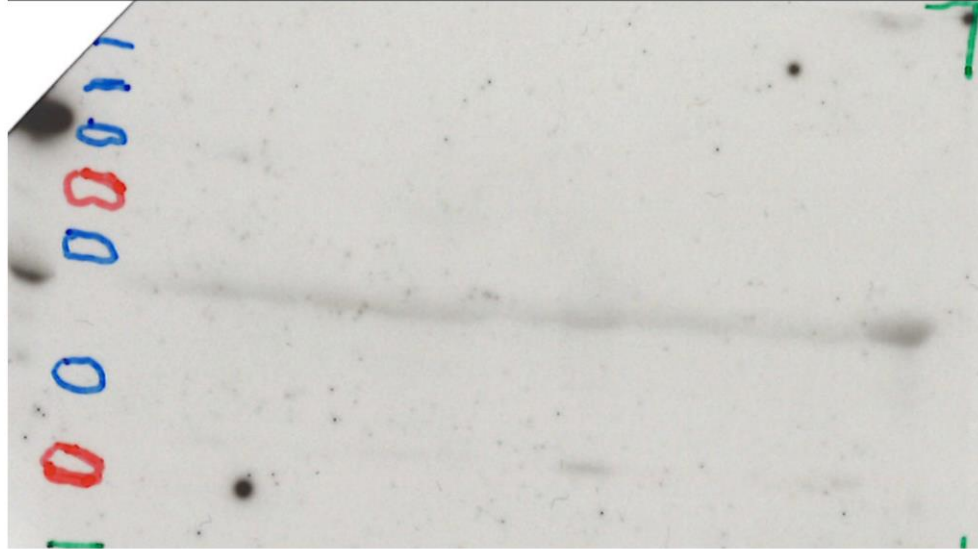
ARR1/pBA002_Myc/Col-0			
Linja	-	+	Ekspressio
12	-	+	vahva
17		+	heikko
18	-	+	vahva
24 tai 26		+	keskivahva
30	-	+	vahva
ARR1/pBA002_Myc/e3a			
2	-	+	heikko
5.6	-	+	heikko

6.2 Toinen sarja

Toisessa sarjassa analysoitiin linjoja ARR1 Δ DDK/pBA002_Myc/Col-0, ARR1 Δ DDK/pBA002_Myc/e3a, ARR1 Δ E3aINT/pBA002_yc/e3a sekä SLK2/pBA002/Myc/Col-0. Linjoissa on ARR1:stä koodaavan geenin mutaatioita, jotka vaikuttavat sen sytokiniinivasteeseen ja stabiiliuteen. Linjassa SLK2/pBA002/Myc/Col-0 merkkiproteiini on kiinnittynyt SLK2-proteiiniin ARR1:sen sijaan.

Sarjassa käytetty merkkiproteiini on Myc, kuten ensimmäisessä sarjassa. Kasvien taustat, Col-0 ja e3a ovat myös samat kuin ensimmäisessä sarjassa.

WB 5		ARR1ΔDDK/pBA002_Myc/Col-0												GM plant	
		1		5		11		21		23		24			
+Myc	L	07.17		07.18		07.19		07.20		07.21		07.22		COL2	tube no.
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	MG132
3	3	13,0	7,2	8,0	4,9	6,1	20,0	9,4	10,0	10,2	9,1	8,8	12,3	12,9	vol. (μl)

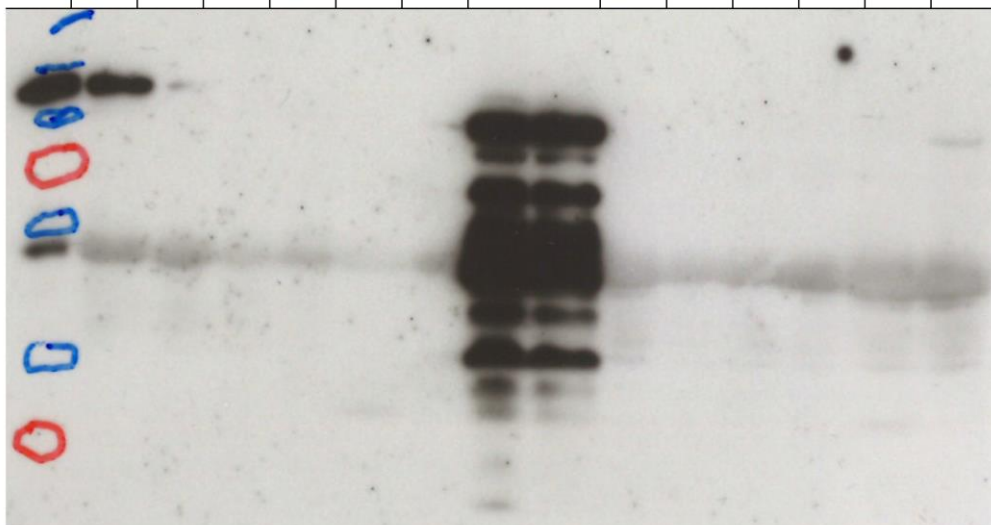


Kuvio 11. Toisen sarjan ensimmäinen blottaus.

Ensimmäisessä blottauksessa ei saatu positiivisesti ekspressoituneita linjoja. Linjassa 1 oli hyvin heikko ekspressio, joka näkyi selkeämmin hyvin pitkän valotusajan jälkeen. Näin heikosti ekspressoitunutta linjaa ei voida käyttää jatkotutkimuksiin.

Membraanilla näkyy kahdessa kohtaa tumma piste, joka ei ole proteiinien ekspressiota. Linjassa 24 voidaan nähdä aivan membraanin yläosassa haalea juova. Tässä sarjassa käytetty rekombinanttiproteiini on kuitenkin niin pieni, ettei se ilmenisi näin ylhäällä membraania.

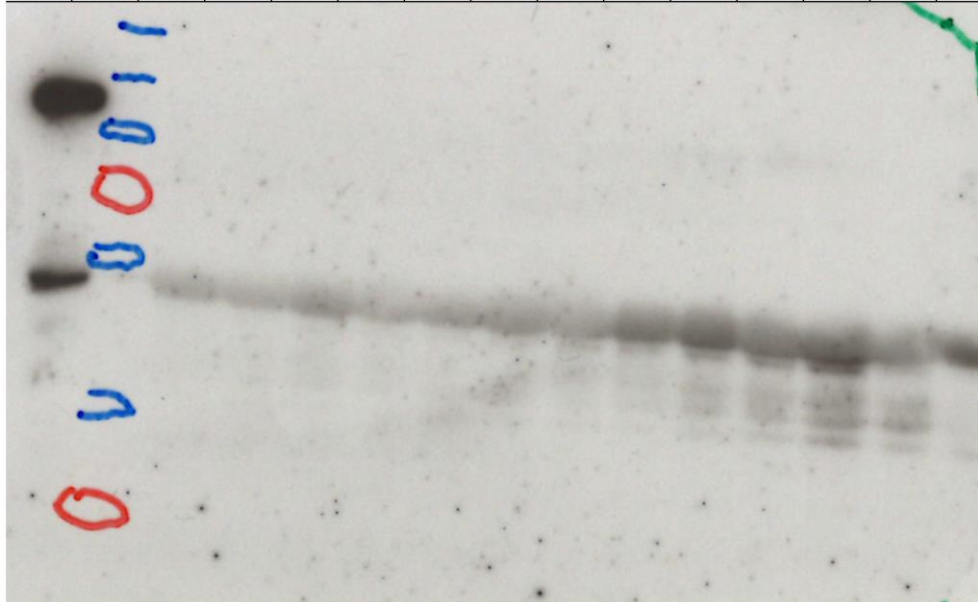
WB 6			ARR1ΔDDK/pBA002_Myc/												GM plant	
			Col-0										e3a			
			25		27		28		29		31		1.4		line no.	
L; +Myc	COL2	e3a2	07.23		07.24		07.25		07.26		07.27		07.37		tube no.	
	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132	
3; 3	12,9	9,9	8,1	7,1	20,0	6,9	20,0	15,9	20,0	9,4	20,0	10,8	20,0	19,3	vol. (μl)	
							keskivahva									



Kuvio 12. Toisen sarjan toinen blottaus.

Toisessa blottauksessa linja 28 oli keskivahvasti positiivinen. Ekspressoitunut rekombinanttiproteiini on samaa kokoluokkaa kuin ensimmäisessä sarjassa havaittavat proteiinit. Tämän takia ekspresio näkyy suunnilleen samassa kohdassa membraania kuin ensimmäisessä sarjassa. Ekspressoituneen proteiinin alla samassa linjassa oleva ekspresio johtuu hajonneista proteiineista. Linjassa 1.4 näkyy ekspresio, joka on kuitenkin niin heikko, ettei kyseistä linjaa voida käyttää jatkotutkimuksiin. Linjassa 31 näkyvä tumma piste ei ole proteiiniekspressiota.

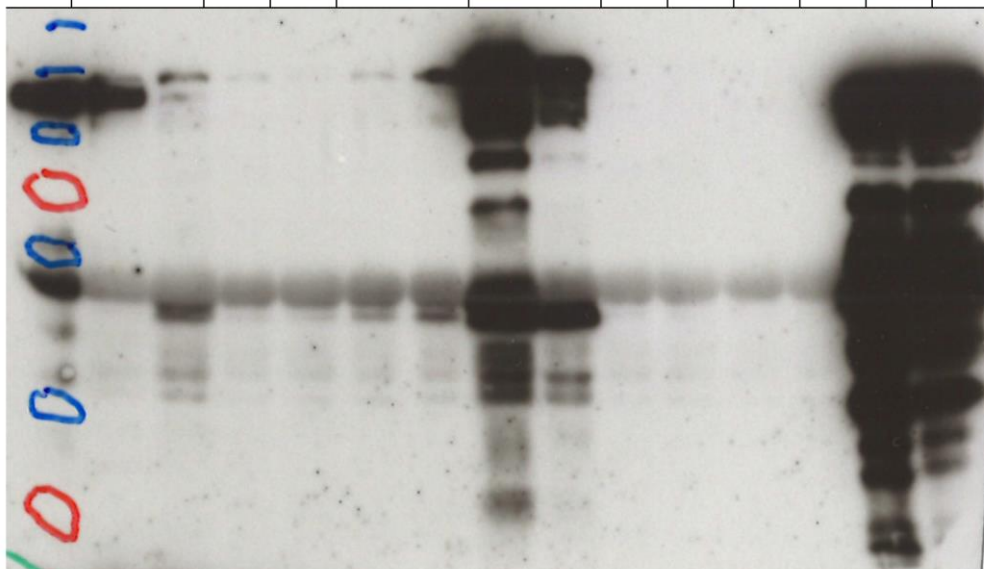
WB 7			ARR1ΔDDK/pBA002_Myc/e3a						ARR1ΔE3aINT/pBA002_Myc/e3a						GM plant
			46		47		53		3		4		8		line no.
+Myc	L	e3a2	07.38		07.39		07.40		07.28		07.29		07.30		tube no.
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132
3	3	9,9	6,8	7,5	6,6	7,8	8,4	6,8	8,7	6,7	9,4	13,1	8,0	8,7	vol. (μl)



Kuvio 13. Toisen sarjan kolmas blottaus.

Ekspressiota ei kuitenkaan havaittu sarjan kolmannen blottauksen yhdessäkään ARR1ΔDDK/pBA002_Myc/e3a linjan kasvissa eikä linjassa ARR1ΔE3aINT/pBA002_Myc/e3a.

WB 8	SLK2/pBA002_Myc/Col-0												GM plant		
	1		2		4		5								line no.
L; +Myc	07.41		07.42		07.43		07.44		COL2		e3a2		1Cβ2		tube no.
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132
3; 3	11,3	17,2	9,4	10,2	9,3	8,4	20,0	10,7	10,1	12,9	9,0	9,9	9,4	12,3	vol. (μl)
	heikko				heikko		keskivahva								



Kuvio 14. Toisen sarjan neljäs blottaus.

Linjasta SLK2/pBA002_Myc/Col-0 saatiin useampi positiivinen linja. Näistä heikkoja olivat 1, 4 ja keskivahva 5. Myös linjassa 2 näkyy hyvin heikko ekspressio, mutta se on liian heikko että kyseinen linja olisi käyttökelpoinen jatkotutkimuksiin. Positiivisesti ekspressoiva linja 1Cβ2 on proteasomi-inhibiittorikontrolli.

Taulukko 5. Yhteenveto toisen sarjan positiivisista linjoista.

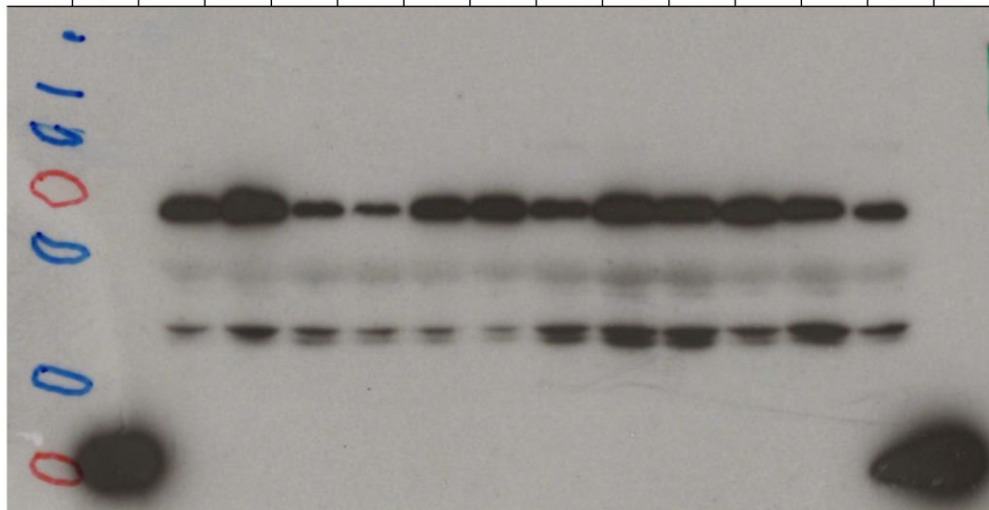
ARR1ΔDDK/pBA002_Myc/Col-0			
Linja	-	+	Ekspressio
28	-	+	keskivahva
SLK2/pBA002_Myc/Col-0			
1	-	+	heikko
4		+	heikko
5	-	+	keskivahva

6.3 Kolmas sarja

Kolmannessa sarjassa analysoitiin linjoja E3awt/pBA002_HA/Col-0, E3awt/pBA002_HA/e3a, E3adn/pBA002_HA/Col-0 ja E3b/pBA002_HA/Col-0. Konstruktit aloittavat niiden koodaaman E3-ligaasin ektooppisen yliekspression β -estradiolikäsittelyn jälkeen. Jatkotutkimuksissa tätä ominaisuutta käytetään E3-ligaasin yliekspression vaikutusten tutkimiseen.

Toisin kuin kahdessa aikaisemmassa sarjassa, tässä sarjassa käytettiin proteiinimerkkiä HA. Muodostunut rekombinanttiproteiini on pienempi kuin Myc-merkin muodostamat rekombinanttiproteiinit, joten ekspressio näkyy ylempänä membraanilla kuin aikaisemmissa sarjoissa. Näissäkin linjoissa käytettiin taustoja Col-0 ja e3a.

WB 9				E3awt/pBA002_HA/										GM plant	
				Col-0								e3a			
				1.6		2.6		7		26		1			
L	+HA	COL3	e3a	07.45		07.46		07.47		07.48		07.49		+HA	tube no.
		+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		MG132
3	5	10,0	14,0	7,8	6,6	9,6	7,5	9,5	8,5	10,3	7,3	9,2	6,5	5	vol. (µl)



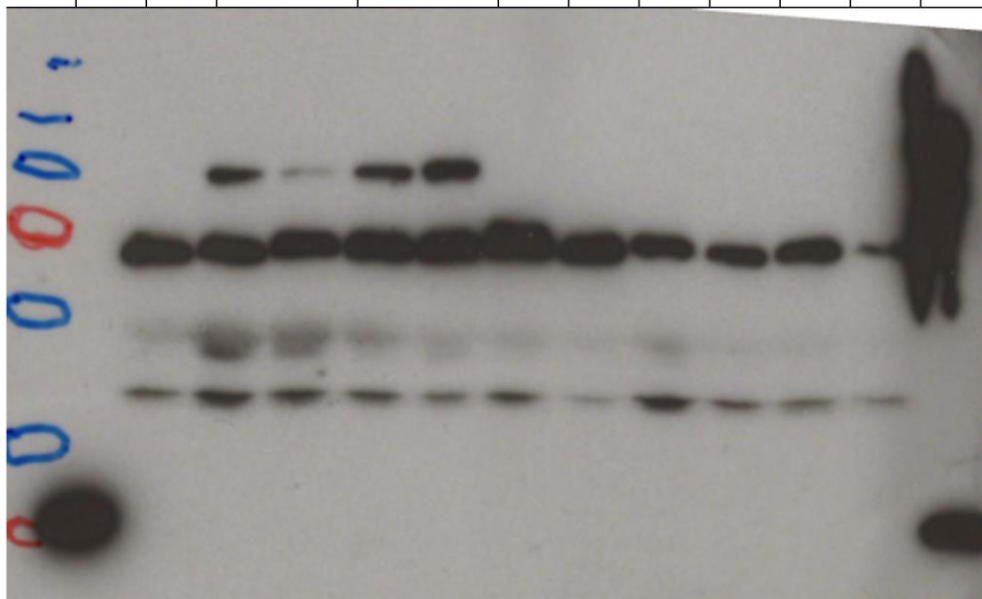
Kuvio 15. Kolmannen sarjan ensimmäinen blottaus.

Ensimmäisessä blottauksessa kaikki näytteet olivat negatiivisia. Kaikissa linjoissa näkyy epäspesifisen taustan lisäksi juovia, jotka näyttävät proteiiniekspressiolta. Katsottaessa

markkerin perusteella näkyvää kohtaa, jossa rekombinanttiproteiini tulee kokonsa perusteella näkyä, voidaan havaita että kyseiset juovat muodostaneet proteiinit ovat liian pieniä. Tällä perusteella voidaan sanoa, että kyseiset linjat eivät ole positiivisesti ekspressoituneet vaan että kyseessä ovat vain hajonneet proteiinit.

Linjoissa 7 ja 1 voitiin havaita ekspressio kahden tunnin valotusajan jälkeen. Näin heikko ekspressio tarkoittaa sitä, etteivät näiden linjojen kasvit ole käyttökelpoisia jatkotutkimuksiin.

WB 10			E3adn/pBA002_HA/Col-0										GM plant	
			1		2		3		18		19		line no.	
L	+HA	COL3	07.50		07.51		07.52		07.53		07.54		+HA	tube no.
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		MG132
3	5	10,0	9,1	13,3	11,6	8,6	15,1	9,5	8,0	7,8	7,8	6,6	5	vol. (µl)
			keskivahva		keskivahva									

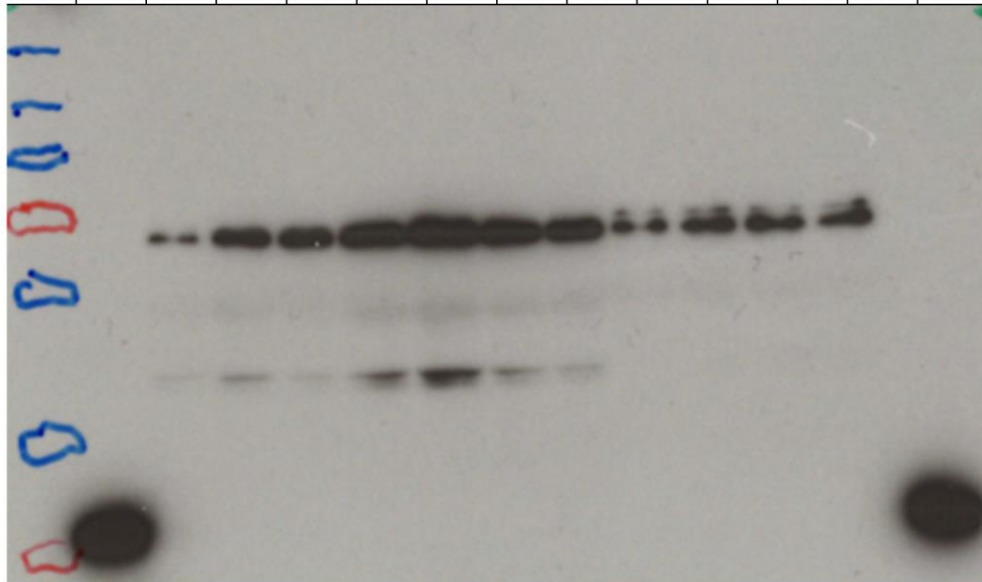


Kuvio 16. Kolmannen sarjan toinen blottaus.

Toisessa blottauksessa saatiin myös käyttökelpoiset linjat 1 ja 2 insertiolinjasta E3adn/pBA002_HA/Col-0. Kaikissa linjoissa näkyvien hajonneiden proteiinien yläpuolella voidaan positiivissa linjoissa nähdä juovat, joiden tiedetään niiden koon perusteella olevan etsittävät rekombinanttiproteiinit.

Toisen blottauksen oikeanpuoleisin näyte on positiivinen kontrolli. Membraanin alaosassa näkyy kontrollin onnistunut ekspressio. Samalla linjalla voidaan nähdä isokokoinen tumma kuvio, joka ei ole kontrollin tuottamaa proteiiniekspressiota ja jonka alkuperä on tuntematon.

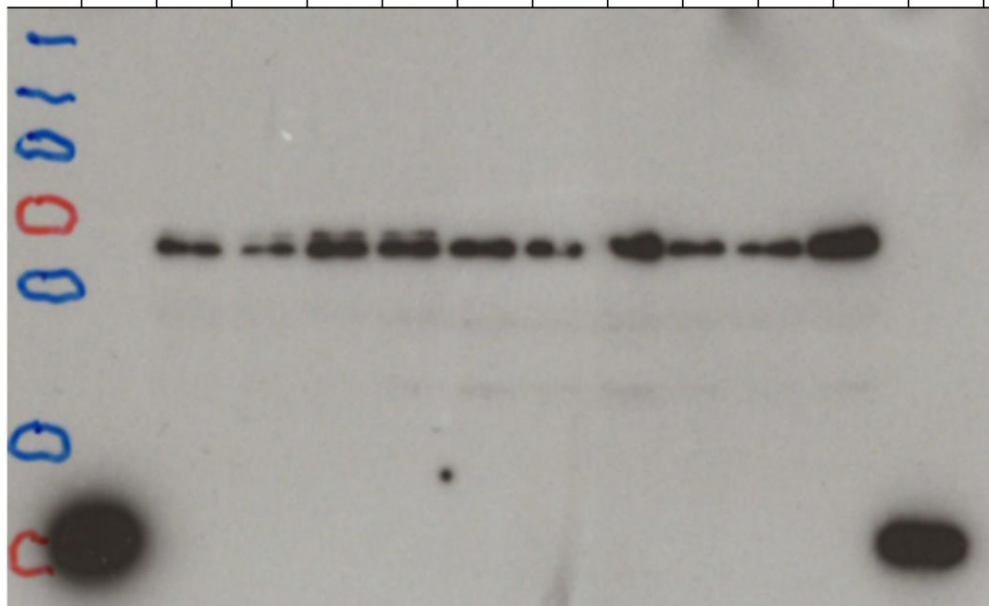
WB 11		E3b/pBA002_HA/Col-0											GM plant	
		4			10.1			12		1		5		line no.
L	+HA	COL3	07.55		07.56		07.57		07.82		07.83		+HA	tube no.
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		MG132
3	5	10,0	12,2	7,3	17,9	17,0	11,9	10,4	13,4	13,8	16,2	13,0	5	vol. (μl)



Kuvio 17. Kolmannen sarjan kolmas blottaus.

Kolmannessa blottauksessa kaikki tutkittavat linjat olivat negatiivisia.

WB 12		E3b/				E3c/				GM plant line no.			
		pBA002_HA/Col-0											
		15		17		#10							
L	+HA	07.84		07.85		07.59		COL3		e3a3		+HA	tube no.
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+		MG132
3	5	20,0	13,9	15,9	15,7	12,8	10,7	14,8	10,0	11,4	14,0	5	vol. (μl)



Kuvio 18. Kolmannen sarjan neljäs blottaus.

Myös neljännen blottauksen kaikki linjat olivat negatiivisia. Blottauksessa oleva insertiolinjan E3c/pBA002_HA/Col-0 linja #10 oli tehty toisen tutkimusryhmän tutkijan puolesta eikä se liity tähän tutkimukseen. Linjan 17 kohdalla membraanin alaosassa näkyvä tumma piste ei ole proteiiniekspressiota.

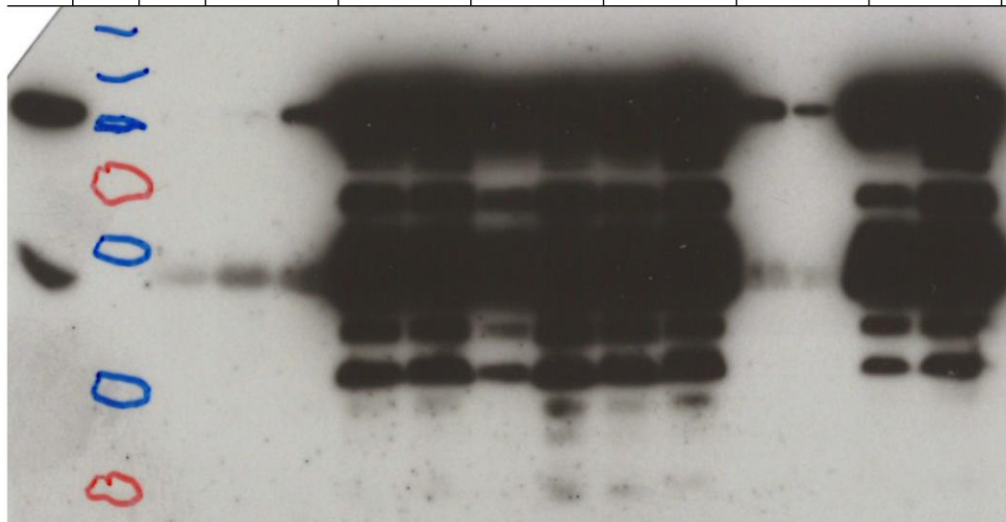
Taulukko 6. Yhteenveto kolmannen sarjan positiivisista linjoista.

E3adn/pBA002_HA/Col-0			
Linja	-	+	Ekspressio
1	-	+	keskivahva
2	-	+	keskivahva

6.4 Neljäs sarja

Neljännessä sarjassa käytettiin kahden konstruktin linjoja (dd-linjat). Linjojen sisältämät konstruktit on listattu neljännessä luvussa. Tässä opinnäytetyössä tutkitaan vain 35S-kontrolloitujen proteiinien ekspressiot, eli niiden proteiinien joissa konstruktissa käytettiin vektoria pBA002_Myc tai pBA002_HA. Jatkotutkimuksissa tullaan myös testaamaan dd-linjan toisen konstruktin ekspressio β -estradiolikäsittelyn jälkeen. Vasta tämän jälkeen voidaan sanoa ovatko seulotut kahden konstruktin linjat oikeasti käyttökelpoisia.

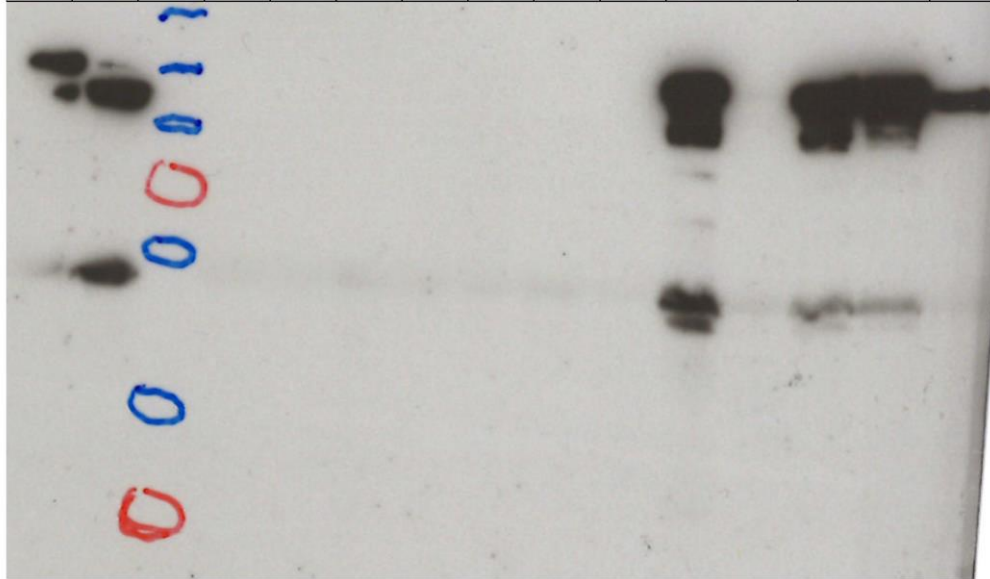
WB 13			dd1												GM plant
			6.2		10.2		15		16		19		21		line no.
+Myc	L	COL4	07.64		07.65		07.66		07.67		07.68		07.86		tube no.
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132
4,5	3	10,5	10,8	12,9	14,3	15,0	11,0	9,0	9,5	20,0	11,1	8,9	15,0	20,0	vol. (μ l)
			vuoto?		vahva		vahva		vahva		vuoto?		vahva		



Kuvio 19. Neljännän sarjan ensimmäinen blottaus.

Ensimmäisessä blottauksessa insertiolinjasta dd1 (konstruktit E3awt/pER10_HA ja ARR1/pBA002_Myc) saatiin useita linjoja jotka olivat positiivisesti ekspressoituneet. Linja 6.2 vaikutti positiiviselta, mutta se tehtiin uudelleen viidennessä sarjassa, koska sen epäiltiin olevan positiivinen viereisen näytepaikan vuodon takia. Myös linja 19 testattiin uudestaan saman syyn takia.

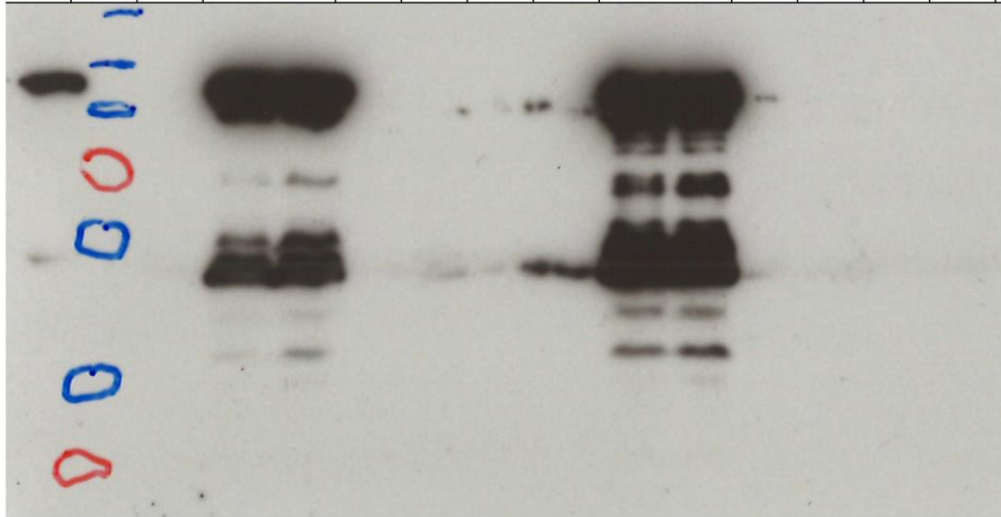
dd9	WB 14			dd3						dd9				GM plant	
13				1		2		3		9		11		13	line no.
07.92	+Myc	L	COL4	07.69		07.70		07.71		07.78		07.91		07.92	tube no.
+			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	MG132
19,0	4,5	3	10,5	11,3	9,2	9,7	12,8	20,0	20,0	12,0	8,0	20,0	20,0	17,7	vol. (µl)
kesk										keskivahva		keskivahva		kesk	



Kuvio 20. Neljännen sarjan toinen blottaus.

Toisessa blottauksessa insertiolinjasta dd9 (konstruktit E3b/pER10_HA ja SLK2/pBA002_Myc) saatiin kolme positiivista näytettä. Pipetoitaessa näytteitä ensimmäinen näyte oli pipetoitu vahingossa toiseen näytepaikkaan minkä takia viimeinen näyte jouduttiin pipetoimaan ensimmäiseen näytepaikkaan. Tämän takia linjan 13 näytteet eivät ole vierekkäin.

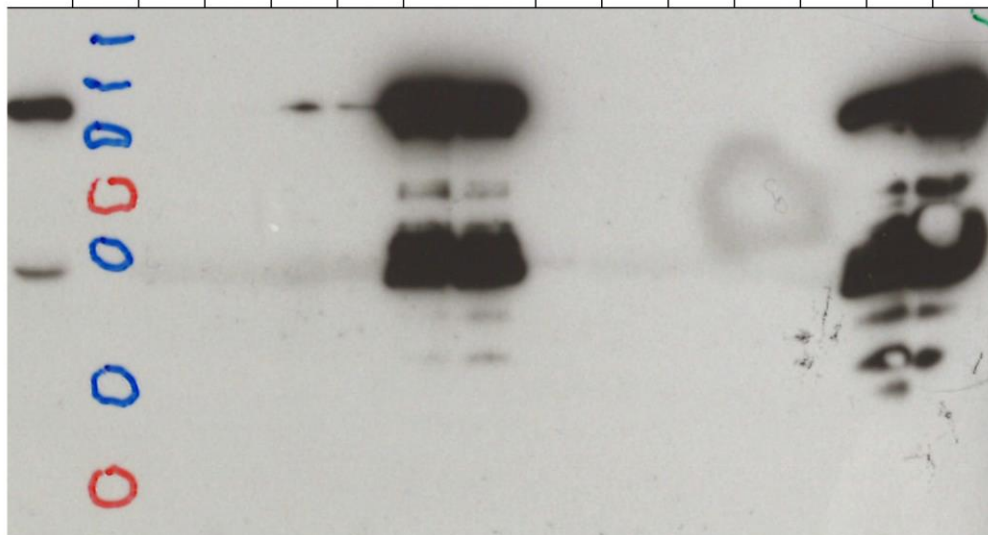
WB 15			dd5								dd7				GM plant
			1		2		6		7		2		3		line no.
+Myc	L	COL4	07.73		07.74		07.87		07.88		07.75		07.76		tube no.
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	MG132
4,5	3	10,5	12,3	14,3	10,2	12,2	20,0	20,0	17,2	14,7	10,5	19,3	12,3	13,3	vol. (µl)
			keskivahva						keskivahva						



Kuvio 21. Neljännän sarjan kolmas blottaus.

Myös dd5-insertiolinjasta (konstruktit E3adn/pER10_HA ja ARR1/pBA002_Myc) saatiin kaksi positiivista linjaa. Nämä olivat linjat 1 ja 7. Linjassa 6 ja insertiolinjan dd7 linjassa 2 näkyy epämääräisiä jälkiä, jotka voivat mahdollisesti olla proteiinin ekspressiota. Nämä oli tarkoitus analysoida uudelleen viidennessä sarjassa, mutta ohjaajani joka määräsi siitä, mitkä linjat tulee seuloa, oli unohtanut sisällyttää ne viidenteen sarjaan. Ne tullaan analysoimaan uudelleen myöhemmin tutkimusryhmän tekemissä jatkotutkimuksissa.

WB 16		dd4		dd6				dd8							GM plant
		12.3		5		6		5							line no.
+Myc	L	07.72		07.89		07.90		07.77	COL4		e3a4		1Cβ4		tube no.
		-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	MG132
4,5	3	11,2	8,9	20,0	8,8	15,9	11,0	15,6	11,9	10,5	13,4	17,2	16,3	8,7	vol. (μl)
						keskivahva									



Kuvio 22. Neljannen sarjan neljäs blottaus.

Neljännessä blottauksessa dd6-insertiolinjan linja 5 oli mahdollisesti positiivisesti ekspressoitunut mutta se tulee testata uudelleen. Se oli alun perin tarkoitus sisällyttää viidenteen sarjaan mutta ohjaajani unohduksen takia uudelleentestaus tehdään myöhemmin. Positiivisesti ekspressoitunut linja 1Cβ4 on kontrolli.

Taulukko 7. Yhteenveto neljannen sarjan positiivisista linjoista.

E3awt/pER10_HA/Col-0			
ARR1/pBA002_Myc/Col-0			
Linja	-	+	Ekspressio
10.2	-	-	vahva
15	-	+	vahva
16	-	+	vahva
19	-	+	vahva
E3b/pER10_HA/Col-0			
SLK2/pBA002_Myc/Col-0			

9	-		keskivahva
11	-	+	keskivahva
13	-	+	keskivahva
E3adn/pER10_HA/Col-0 ARR1/pBA002_Myc/Col-0			
1	-	+	keskivahva
7	-	+	keskivahva
E3adn/pER10_HA/e3a ARR1/pBA002_Myc/e3a			
6	-	+	keskivahva

6.5 Viides sarja

Viidennessä sarjassa analysoitiin sellaisia näytteitä, joiden tulokset olivat aikaisemmissa sarjoissa jääneet epäselviksi tai jotka ohjaajani muuten halusi seuloa uudestaan.

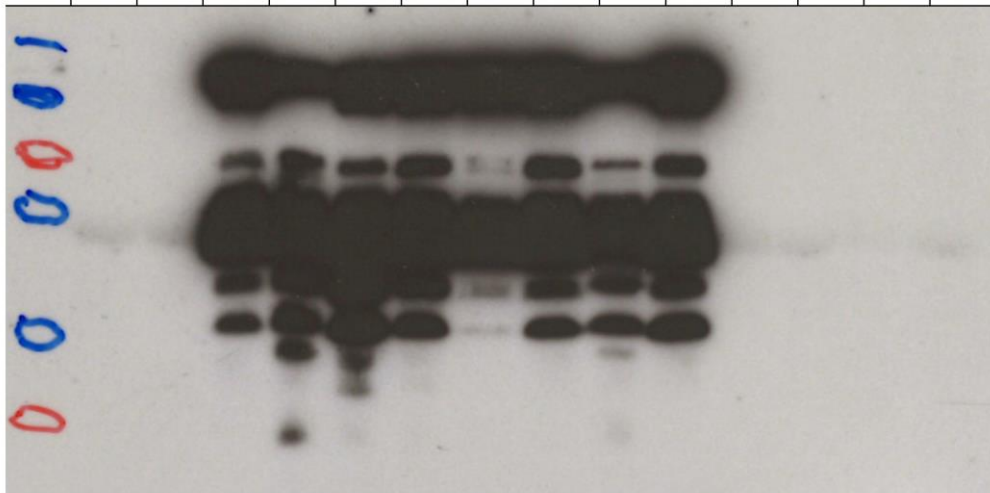
WB 17		ARR1ΔDDK/pBA002_Myc/Col-0													GM pla
		1		5		11		21		23		24			line no
+Myc	L	07.17		07.18		07.19		07.20		07.21		07.22		COL2	tube no
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	MG13
3	3	13,0	7,2	8,0	8,0	6,1	20,0	9,4	10,0	10,2	9,1	8,8	12,3	12,9	vol. (μ

Kuvio 23. Viidennen sarjan ensimmäinen blottaus.

Ensimmäisessä blottauksessa seulottiin uudelleen toisen sarjan näytteitä. Seulotut linjat olivat kuitenkin negatiivisia.

WB 18

WB 18												ARR1/pBA002_Myc/Col-0		ARR1ADOK/pBA002_MycpBA002_Myc/Col-0		ARR1SCINT/pBA002_Myc/e3a	GM plant
												29		27		8	line no.
L; +Myc	COL2	e3a2	1Cβ1		1Cβ2		1Cβ3		1Cβ4		07.80		07.24	07.30	tube no.		
	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	MG132		
3; 3	12,9	9,9	10,2	7,7	9,4	12,3	10,0*	10,0*	16,3	10,0	18,4	12,0	10,0	10,0	vol. (μl)		



Kuvio 24. Viidennen sarjan toinen blottaus.

Viidennen sarjan toisessa blottauksessa testattiin käytettyjä proteasomi-inhibiittorikontroleja. Lisäksi linjan 29 analyysi oli epäonnistunut ensimmäisessä sarjassa, joten se tehtiin uudestaan. Näytteen todettiin olevan oikeastikin negatiivinen.

WB 19		dd1				dd3						dd4		dd8	GM plant
		6.2		19		1		2		3		12.3		5	line no.
L;	COL4	07.64		07.68		07.69		07.70		07.71		07.72		07.77	tube no.
+Myc	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	MG132
3; 3	10,5	10,8	12,9	11,1	12,0	11,3	9,2	9,7	12,8	20,0	20,0	11,2	8,9	15,6	vol. (µl)
		heikko													



Kuvio 25. Viidennen sarjan kolmas blottaus.

Kolmannessa blottauksessa yksi uudelleen testattavista linjoista oli dd1-insertiolinjan 6.2, jonka epäiltiin olevan positiivisesti ekspressoitunut mahdollisen vuodon takia pipe-toitaessa näytteitä. Uudelleen tehty blottaus kuitenkin osoitti että se oli oikeasti positiivinen. Toinen uudelleen testattu linja oli saman insertiolinjan linja 19, jonka ekspressio oli heikkoa verrattaessa muihin saman sarjan ekspressoiviin näytteisiin. Uudelleen testattaessa se antoi negatiivisen ekspression. Tämä osoittaa että alkuperäinen positiivinen tulos johtui viereisten, voimakkaasti ekspressoivien näytteiden vuodosta näytteitä pipe-toitaessa.

Viidennessä sarjassa tehtiin myös neljäs blottaus, mutta sen tarkoituksena oli testata uusien, tutkimusryhmän myöhemmin käyttämien vasta-aineiden toimintaa. Se ei siis liity tähän opinnäytetyöhön.

6.6 Arviointi

Proteiinien eristys oli onnistunut pääpiirteissään hyvin. Coomassie-värillä käsitellyissä geeleillä näkyi erikoisia tummia juosteita geelin yläosassa, jotka vaikuttivat siltä kuin proteiinit ei olisi liikkuneet kunnolla geelielektroforeesin aikana. Koska kyseiset näytteet kuitenkin antoivat immunoblottauksessa positiivisia tuloksia, eivät tummat juosteet johdu tästä.

Eristyksessä käytettiin todennäköisesti liian paljon kasvimateriaalia, mikä näkyi hyvin suurena proteiinipitoisuutena osassa positiivisista näytteistä. Tutkimuksessa haluttiin käyttää ainakin kolmea versoa jokaisessa näytteessä, jotta tulokset olisivat luotettavampia. Kasvuajan pituuden takia osa taimista olivat kasvaneet jo melko suurikokoisiksi.

Immunoblottausta varten pyrittiin käyttämään yhtä suurta proteiinkonsentraatiota jokaisessa näytteessä, jotta pystyttäisiin vertailemaan rekombinanttiproteiinien ekspressiota eri linjojen välillä ja saman linjan ekspressiota sekä proteasomi-inhibiittorikäsittelyn jälkeen että ilman sitä. Näin voidaan nähdä onko proteasomi-inhibiittorikäsittely kohottanut tutkittavan proteiinin pitoisuutta näytteessä. Lisäksi vertailu positiivisiin ja negatiivisiin kontrolleihin vaati näytteiden tasaista konsentraatiota.

Katsottaessa Coomassie-värijätyjä geelejä nähtiin että osassa tapauksissa näytteiden tasainen pipetointi oli onnistunut hyvin ja osassa ei. Pipetointitekniikan lisäksi näytekonsentraatioiden epätasapaino on saattanut johtua useista eri seikoista, kuten häiriöistä konsentraation mittauksen aikana.

Odotettu proteiinipitoisuuden kasvu proteasomi-inhibiittorikäsittelyn jälkeen ei näkynyt kaikissa ekspressoivissa näytteissä. Tämä voi johtua monista eri syistä. E3b- ja SLK2-proteiinit eivät välttämättä ole epästabiileja, sillä niistä ei ole aikaisemmin tutkittu kyseistä ominaisuutta. On mahdollista että tämän takia MG-132-käsittely ei vaikuta kyseisten proteiinien pitoisuuteen. Myös proteiinkonsentraation epätasapainoisuus näytteiden välillä voi johtaa siihen että näytteitä ei voi kunnolla vertailla. Proteasomi-inhibiittorikäsittely ei välttämättä ole ollut kaikilla kasveilla optimaalinen. Esimerkiksi kasvit eivät olleet kunnolla immersoituneet nesteeseen tai inhibiittori ei ollut liennut kunnolla taustamediaan. Käsiteltyjen ja käsittelemättömien näytteiden paikka on voinut vaihtua huolimattomuuden takia, jolloin vaikuttaa siltä että proteiinia on enemmän näytteessä, jota ei käsitelty. Tämä

on todennäköistä näytteen 1Cβ1 kohdalla. Koska käytetyt kasvit eivät olleet tässä vaiheessa täysin segregoituneet, on mahdollista että käsitellyissä näytteissä on enemmän heterotsygoottisia taimia, jolloin niissä on vähemmän insertioita, joka johtaa heikompaan ekspressioon. Jos näytteissä, joita ei käsitelty proteasomi-inhibiittorilla on enemmän homotsygoottisia näytteitä, myös niiden osoittama proteiiniekspressio on suurempi.

Linjojen jotka kasvoivat selektiomaljoilla, voisi olettaa olevan transgeenisia, sillä siirrettävä vektori sisältää resistenssin antavan alueen. Tästä huolimatta kaikki tällaiset linjat eivät osoittaneet ekspressiota. Tämä voi johtua siitä että insertio osui genomien kohtaan, joka ei ole transkriptiivisesti aktiivinen. Siirretty alue voi myös joutua genomien hiljentämäksi. Etsittävät proteiinit voivat myös olla hyvin epästabiileja, mikä johtaa siihen että proteiinia ei voida havaita, ellei ekspressio ole hyvin korkea. Insertion kohta genomissa myös vaikuttaa ekspressioon.

Yhdessä membraanissa ei näkynyt positiivista kontrollia. Kontrolli oli kuitenkin todennäköisesti pipetoitu, sillä proteiinien jättämät jäljet pystyttiin havaitsemaan käytetyssä geelissä. Toisella membraanilla epäiltiin yhden näytteen analyysin epäonnistuneen, koska siinä ei näkynyt edes epäspesifistä taustaa, joka nähtiin muilla saman blottausten näytteillä. Tällöin ei voitu tietää oliko näyte oikeasti negatiivinen vai oliko näytteen blottaus epäonnistunut. Tämä näyte tehtiin uudestaan viidennessä sarjassa oikean tuloksen varmistamiseksi. Nämä epäonnistuneet näytteet olivat kummatkin membraanin reunassa, joten on mahdollista että membraanin reuna oli kuivunut jossain vaiheessa, joka johti siihen että vasta-ainekäsittely ei onnistunut kunnolla. On myös mahdollista että ECL-käsittelyssä substraatti ei ollut tarttunut kunnolla membraanin reunaan. Positiivisen kontrollin puute ei välttämättä haittaa sillä samalta membraanilta nähtiin positiivisia tuloksia, jolloin tiedettiin että blottaus oli onnistunut. Lisäksi kaikki positiiviset näytteet pitää vielä tulevaisuudessa testata uudelleen.

6.7 Luotettavuuden ja eettisyyden arviointi

Opinnäytetyön aikana tehdyt laboratoriotyöt suoritettiin tutkimusryhmän käyttämiä työohjeita noudattaen. Kaikki toteutuksen aikana saatu tieto, esimerkiksi segregoitujen kasvien selviytymisprosentit ja proteiinikonsentraation mittauksessa saadut näytteiden absorbanssiarvot, on dokumentoitu ja tallennettu tutkimusryhmän toimesta. Kaikki työvaiheet olivat yhden ja saman henkilön suorittamia.

Opinnäytetyön aikana käsiteltiin geneettisesti modifioituja (GMO) kasveja. Niiden käsittelyyn kiinnitettiin huomiota siten, että geneettisesti muokattujen siementen ja muiden kasvinosien leviäminen ympäristöön on tehty mahdottomaksi. Työvaiheet tehtiin steriileissä olosuhteissa sekä leviämisen että kontaminaatioiden välttämiseksi. Käsittelyssä syntyvät roskat ja ylimääräiset siemenet hävitettiin asiaankuuluvalla tavalla poltettavaksi.

Tämä opinnäytetyö ei itsessään tuota uutta tietoa vaan sen aikana seulottuja kasveja voidaan tulevaisuudessa käyttää tieteelliseen tutkimukseen. Ennen kuin tämän opinnäytetyön tuottamien positiivisten linjojen antamien tulosten perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä, tulee kaikki tulokset vielä testata uudelleen tulevaisuudessa.

6.8 Jatkotutkimukset

Opinnäytetyöstä saatujen tulosten pohjalta voidaan tehdä useita jatkotutkimuksia. Käytetyt linjat tulisi saattaa homotsygoottisiksi, jotta MG-132-kästellyn tuloksia voitaisi vertailla luotettavammin. Homotsygoottisista linjoista myös tuotetaan suuri määrä siemeniä tulevia tutkimuksia varten. Useampien linjojen seulonta voisi paljastaa uusia konstrukti/tausta-yhdistelmiä. Positiiviset yhden insertion linjat voidaan risteyttää, joka on vaihtoehtoinen tapa saada ”double dipping”-linjoja.

Positiivisesti ekspressoituneet dd-linjat tullaan käsittelemään beeta-estradiolilla, joka johtaa niissä olevien tutkittavien E3-ligaasien jatkuvaan yliekspressioon. Tämän jälkeen voidaan katsoa miten E3-ligaasin yliekspressio vaikuttaa jo aiemmin todettuun kohdeproteiinin ekspressioon.

Ennen kuin tehdyistä testeistä voidaan tehdä lopullisia johtopäätöksiä, tulee ne vielä toistaa useamman kerran. Tämä on normaali käytäntö tutkimustyössä biologisten näytteiden parissa, sillä tuloksiin voi vaikuttaa hyvin monet molekyyllitasolla tapahtuvat asiat. Tämän takia vasta monen kerran jälkeen toistuvat tulokset ovat luotettavia.

Lähteet

The Arabidopsis Information Resource. About Arabidopsis. Verkkodokumentti. Luettu 31.3.2016. <<https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>>

Argo, Bill. 2003. Understanding pH management and plant nutrition. Journal of the International Phalaenopsis Alliance. Vol 12 (4).

Argyros, Rebecca – Mathews, Dennis – Chiang, Yi-Hsuan – Palmer, Christine – Thibault, Derek – Etheridge, Naomi – Argyros, D. Aaron – Mason, Michael – Kieber, Joseph – Schaller, G. Eric. 2008. Type B Response Regulators of Arabidopsis Play Key Roles in Cytokinin Signaling and Plant Development. Plant Cell 20(8):2102–2116.

Bao, Fang – Azhakanandam, Sridevi – Franks, Robert G. 2010. SEUSS and SEUSS-LIKE Transcriptional Adaptors Regulate Floral and Embryonic Development in Arabidopsis. Plant Physiology vol. 152 no. 2 821-836.

Bilicka, Marcelina. 2016. Suullinen ohjeistus ja työohjeet.

Burr, Christian A. – Sacks, Carly M. – Kieber, Joseph J. 2014. Two-Component Signaling in Plants. ELS.

Callis, Judy. 1995. Regulation of Protein Degradation. American Society of Plant Physiologists. The Plant Cell. Vol 7. 845-857.

Davidson College. 2001. SDS-PAGE. Department of Biology. Verkkodokumentti. Luettu 4.4.2016. <<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/sdspage/sdspage.html>>

European Molecular Biology Laboratory. Protein Purification. Extraction and Clarification Choice of lysis buffer and additives. Verkkodokumentti. Luettu 4.4.2016. <https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/lysis_buffer_additives/>

Ferreira, F. J – Kieber, J. J. 2005. Cytokinin Signaling. Current Opinion in Plant Biology. 8(5), 518-525.

Haartman-Petersen, R. – Gordon C. 2004. Proteins Interacting with the 26S Proteasome. Cellular and Molecular Life Sciences. 61(13):1589-95.

Harlow, Edward – Lane, David. 1999. Using Antibodies: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Hartwell, Leland – Hood, Leroy – Goldberg, Michael – Reynolds, Ann E. – Silver, Lee. 2004 Genetics: from Genes to Genomes. Toinen painos. Boston, Mass: McGraw-Hill Higher Education.

Harvard University. Cytokinin Signaling Pathway. Sheen Lab. Verkkodokumentti. Luettu 31.3.2016. < http://molbio.mgh.harvard.edu/sheenweb/cytokinin_signaling.html>

Helariutta, Yrjö. 2002. "Kasvikunnan banaanikärpäsen" lituruohongeenikartoitus jouduttaa myös metsäpuidengeenistön tuntemista. Metsätieteen aikakauskirja 2/2002.

HelloBio. MG-132. Product Overview. Verkkodokumentti. Luettu 31.3.2016.
<<http://www.hellobio.com/mg-132.html?picat=&q=mg132>>

Hicke L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:195-201.

Hoppe, T. – Matuschewski, K. – Rape, M. – Schlenker, S. – Ulrich, HD. – Jentsch, S. 2000. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependant processing. *Cell* 102:577-86.

Koch, Marcus A. – Wernisch, Michaela – Schmickl, Roswitha. 2007. *Arabidopsis thaliana's wild relatives: an updated overview on systematics, taxonomy and evolution.* *Taxon.* 57:933-943.

Lee, Joanne E. – Lampugnani, Edwin R. – Bacic, Anthony – Golz, John F. 2014. SEUSS and SEUSS-LIKE 2 coordinate auxin distribution and KNOX1 activity during embryogenesis. *The Plant Journal.* Volume 80. 122-135.

Lijing, Liu – Yiyue, Zhang – Sanyuan, Tang – Qingzhen, Zhang – Zhonghui, Zhang – Huawei, Zhang – Li, Dong – Huishan, Guo – Qi, Xie. 2010. An efficient system to detect protein ubiquitination by agroinfiltration in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal.* 61, 893-903.

Misawa, Masanaru. 1994. *Plant Tissue Culture: an Alternative for Production of Useful Metabolite.* FAO Agricultural Services Bulletin No. 108. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome 1994.

Moon, Jennifer – Parry, Geraint – Estelle, Mark. 2004. The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Plant Development. *The Plant Cell.* Vol 16 no. 12 3181-3195.

National diagnostics. 2011. Staining protein gels with coomassie blue. Verkkodokumentti. Luettu 7.3.2016. <<https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/staining-protein-gels-coomassie-blue>>

National Science Foundation. *Arabidopsis: The Model Plant.* 2002. Verkkodokumentti. Luettu 31.3.2016. <<http://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm>>

Rice University. 1995. Bradford Protein Assay. Verkkodokumentti. Luettu 4.4.2016. <<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/protein/bradford.html>>

Rice University. 1996. Preparing Protein Samples for Electrophoresis. Verkkodokumentti. Luettu 4.4.2016. <<http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/studies/sds-page/denaturation.html>>

Roe, Simon. 2001. *Protein Purification Applications Second Edition.* Oxford University Press.

Sadanandom, Ari – Bailey, Mark – Ewan, Richard – Lee, Jack – Nelis, Stuart. 2012. The ubiquitin–proteasome system: central modifier of plant signalling. *New Phytologist.* 196(1):13-28.

Sauer, D. B – Burroughs, R. 1986. Disinfection of Seed Surfaces with Sodium Hypochlorite. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, U.S Grain Marketing Research Laboratory, Manhattan and Department of Grain Science and Industry, Kansas State University.

Scitable. 2014. Gel Electrophoresis. Scitable by Nature Education. Verkkodokumentti. Luettu 4.4.2016. <<http://www.nature.com/scitable/definition/gel-electrophoresis-286>>

Shrestha, Barsha – Guragain, Bhuwan – Sridhar, Vaniyambadi. 2014. Involvement of co-repressor LUH and the adapterproteins SLK1 and SLK2 in the regulation of abiotic stress response genes in Arabidopsis. BMC Plant Biology. 14:54.

Smalle, Jan – Vierstra, Richard D. 2004. The Ubiquitin 26S Proteasome Proteolytic Pathway. Annual Review of Plant Biology. Vol. 55: 555-590.

Suominen, Ilari – Haajanen, Kari – Pärssinen, Raimo. 2012. Biogeeni Ammatillista biokemian ja geenitekniikkaa. Opetushallitus 2012.

Suominen, Ilari – Pärssinen, Raimo – Haajanen, Kari – Pelkonen, Jani. 2013. Geenitekniikka. Saarijärvi: Turun ammattikorkeakoulu.

Solunetti. 2006. Proteiinien SDS-PAGE. Verkkodokumentti. Luettu 4.4.2016. <http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/>

Solunetti. 2006. Proteasomit. Verkkodokumentti. Luettu 31.3.2016. <<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteasomit/>>

Thermo Fisher. Overview of Cell Lysis and Protein Extraction. Verkkodokumentti. Luettu 4.4.2016. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-cell-lysis-and-protein-extraction.html>>

Vasil, Indra K. – Thorpe, Trevor A. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Springer Netherlands.

Vierstra RD. 1993. Protein degradation in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44:385-410.

Vierstra RD. 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. Plant Mol. Biol. 32:275-302.

Vierstra RD. 2003. The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. Trends Plant Sci. 8:135-42.

Welinder, C – Ekblom, L. 2011. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. Journal of Proteasome Research. March 4;10(3):1416-9.

Wilson, Keith – Walker, John. 2005. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. Sixth edition. New York. Cambridge University Press.

